DIE EMBRYOGENESE DES HUHNES UNTER DEM EINFLUSS VON L-THYROXIN, THIOHARNSTOFF, CYCLOHEXIMID UND CHLORAMPHENICOL

Roswitha Elisabeth Fremmer

Diss
München
1984

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von
Priv. Doz. Dr. Dr. habil. J. Wittmann

Die Embryogenese des Huhnes unter dem Einfluß von L-Thyroxin, Thioharnstoff, Cycloheximid und Chloramphenicol

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Roswitha Elisabeth Fremmer
aus
Marquartstein

München 1984

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Universität München

Dekan:	Prof. Dr. W. Leidl
Referent:	Priv.Doz. Dr. Dr.habil. J. Wittmann
Korreferent:	Prof. Dr. A. Petter

Tag der Promotion: 27. Juli 1984

Für R. K.

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Allgemeiner Teil

1.1. Einleitung 1
1.2. Entwicklung der Thyreoidea 2
1.3. Synthese und Sekretion der thyreoiden Hormone 3
1.4. Wirkungen der Schilddrüsenhormone auf Wachstum und Energiemetabolismus 5
1.5. Hemmung der Schilddrüsenfunktion 7
1.6. Die Wirkung von Cycloheximid 8
1.7. Die Wirkung von Chloramphenicol 10
1.8. Der Stickstoffmetabolismus des Hühnerembryos 13
1.9. Entstehung und Funktion der Allantois beim Hühnerembryo 14

2. Zielsetzung 16

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden
3.1.1. Versuchstiere 18
3.1.2. Reagentien 18
3.1.3. Untersuchungen an Hühnerembryonen der frühen Entwicklungsphase
3.1.3.1. Applikation der Substanzen 19
3.1.3.2. Bestimmung der Glutamatdehydrogenase, EC 1.4.1.3. 20
3.1.3.3. Bestimmung der Phosphoribosylpyrophosphattransaminase EC 2.4.2.14 20

3.1.3.4. Bestimmung der Einbaurate von radioaktiv-markierter Glutaminsäure in embryonales Protein 21
3.1.3.5. Bestimmung der ATP-, ADP-, und AMP-Konzentration 23
3.1.3.6. Bestimmung der Harnsäure-, Inosin-, Hypoxanthin-, und Xanthin-Konzentration in der Allantoisflüssigkeit 24
3.1.4. Untersuchungen an Hühnerembryonen der späten Entwicklungphase 26
3.1.4.2. Bestimmung von Gewichtsparametern 26
3.1.4.3. Bestimmung der Phophoribosylpyrophosphat-transaminase, EC 2.4.2.14, im Leberhomogenat 27
3.1.4.4. Bestimmung des Leberpigmentes und des Cholesterins 27
3.1.4.5. Bestimmung der Glucose und Glykogenkonzentration in der Leber 28
3.1.5. Statistische Berechnung 29

3.2. Ergebnisse der Untersuchungen der frühen Entwicklungphase
3.2.1. Beeinflusssung des Wachstums und des Proteinstoffwechsels 30
3.2.2. Beeinflusssung der Enzymaktivitäten 37
3.2.3. Beeinflussung der Ausscheidungsrate von Purinkörpern 41

3.3. Ergebnisse der Untersuchungen der späten Entwicklungphase
3.3.1. Beeinflussung des Wachstums 45
3.3.2. Beeinflussung der Phosphoribosylpyrophosphat-transaminaseaktivität und der Glutamatkonzentration in der Leber 50

Seite

3.3.3. Beeinflusssung von Lebermetaboliten 54

4. Diskussion 60

5. Zusammenfassung 69

6. Literaturverzeichnis 71

1. Allgemeiner Teil

1.1. Einleitung

Voraussetzung für die embryonale Entwicklung ist die genetisch programmierte Proteinsynthese, die mit der rapiden Zellteilung in den frühen und späten Organogenesephasen Schritt halten kann.

Bei oviparen Spezies sind die für die Proteinsynthese erforderlichen Stickstoffverbindungen im Eidotter und Eiklar enthalten. Der Umbau dieser Substanzen in das embryonale Gewebe erfolgt nach einem genau vorgeschriebenen Plan.
In der Anfangsphase der Embryogenese sorgen proteolytische Enzyme, die schon vor der Bebrütung im Dotter nachgewiesen werden können, dafür, daß der Embryo ausreichend mit freien Aminosäuren versorgt wird. Intaktes Dotterprotein wird wahrscheinlich nur in Spuren aufgenommen (72). Schon 29 h nach Beginn der Inkubation kann eine embryonale Proteinsynthese nachgewiesen werden (26).
Das Protein des Eiklars steht dem Hühnerembryo im großen Umfang erst um den 13. Tag zur Verfügung. Um diesen Zeitpunkt erfolgt ein Durchbruch des "Weißeisackes" in die Amnionhöhle. Das Eiklar vermischt sich mit der Amnionflüssigkeit und wird von Embryo abgeschluckt (41). Es dient ihm bis zum 17. Tag als wichtigste Stickstoffquelle.

Für den Energiestoffwechsel ist das Eiprotein von untergeordneter Bedeutung. Nur etwa zu 6% wird das Dotterprotein, das aus Lipoproteinen und wasserlöslichen Serumproteinen zusammengesetzt ist, für

die Energiegewinnung herangezogen (78). In den ersten Tagen der Entwicklung stellen einfache Kohlenhydrate, deren Konzentration im Ei sehr gering ist, die Hauptenergiequelle dar. Später werden hierfür die Dotterlipide eingesetzt, die vor allem aus Triglyceriden, weniger aus Phospholipiden und Cholesterin bestehen. Diese machen etwa 2/3 des gesamten Dotters aus (79).

Seit langem ist bekannt, daß die embryonale Entwicklung unter dem Einfluß von Schilddrüsenhormonen steht. Die ersten Hinweise hierfür wurden an Salamanderlarven, die mit aviären Schilddrüsen versorgt wurden, erhalten (64). Umgekehrt kann durch Thyreostatika die Entwicklung verlangsamt werden. Diese entgegengesetzt verlaufende Wirkung von Schilddrüsenhormonen und Thyreostatika kommt offensichtlich durch den stimulierenden bzw. hemmenden Effekt auf die Proteinsynthese zustande. Ähnlich wie durch Goitrogene wird die Proteinsynthese auch durch bestimmte Antibiotika beeinträchtigt.

Im Folgenden soll Entwicklung und Funktion der Schilddrüse, sowie die Wirkungsweise der Thyreostatika und Antibiotika im Proteinstoffwechsel am Beispiel von Thioharnstoff bzw. Cycloheximid und Chloramphenicol, die in den gesamten Versuchen dieser Arbeit eingesetzt wurden, näher dargelegt werden.

1.2. Entwicklung der Thyreoidea

Die Schilddrüse des Haushuhnes entsteht am 2. - 3. Tag der Inkubation als Divertikel aus dem entodermalen

Epithel des Mundhöhlenbodens. Etwa am 5. Tag der Entwicklung wird die Anlage paarig. Im Epithel formieren sich Zellgruppen, die jeweils einen kleinen Hohlraum umschließen, der um den 8. Tag mit kolloidaler Flüssigkeit gefüllt wird. Zur gleichen Zeit breiten sich innerhalb der Drüse gleichmäßig sinusoide Blutgefäße aus. Durch Fusion mit benachbarten Follikeln sowie durch Teilung angrenzender Zellen nimmt die Größe der Follikel zu. Am 10. Tag erreicht die sinusoide Vaskularisierung ihre maximale Ausbildung und wandelt sich bis zum 12. Tag zu einem kappilaren Netzwerk um. Zwischen 14. und 15. Tag ist die Entwicklung der Schilddrüse abgeschlossen. Im Gegensatz zum Säuger, bei dem sie in nachbarlicher Beziehung mit dem Kehlkopf verbleibt, verlagert sich die Thyreoidea beim Vogel weit nach kaudal unmittelbar hinter die Brustapertur. Die Drüsenform von Huhn, Gans und Ente ist oval, die der Taube spindelförmig (22, 41, 71).

1.3. Synthese und Sekretion der thyreoiden Hormone

Das Ovar der Legehenne scheidet etwa 21 µg Jod in den Dotter ab. Dieses für die Schilddrüsenhormonsynthese essentielle Element liegt zu 80% protein- und lipidgebunden in Form von aktivem Jodid bzw. inaktivem Monojodhistidin vor. In dem Eiklar und in der Schale sind nur geringe Mengen jodhaltiger Verbindungen anzutreffen (27).
Es gibt keinen Hinweis, daß sich der biosynthetische Mechanismus der Hormonproduktion der Vögel von dem der Säuger unterscheidet. THOMMES (70) nimmt an, daß die Fähigkeit der Schilddrüsenanlage Jodid zu konzentrieren mit dem 5. Tag der Inkubation ausgebildet wird.

Das ist die Voraussetzung für die Bildung von Mono- und Dijodthyrosin. In höherer Konzentration werden diese Zwischenprodukte um den 8. - 9. Tag in der Schilddrüse nachgewiesen. Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie lassen sich jodierte Thyrosinmoleküle bereits vor diesem Zeitraum nachweisen. Es muß hierbei, ebenso wie bei dem schon um den 6. - 7. Tag nachgewiesenen L-Thyroxin, die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß diese Produkte aus dem Dotter herrühren (71, 70).
Das aus den Vorstufen gebildete L-Thyroxin wird beim Vogelembryo um den 10. Tag in den Blutstrom ausgeschleust (11). Beim Menschen kann ab der 12. Woche fetales L-Thyroxin (T_4) nachgewiesen werden (1). Trijodthyronin (T_3) wird zum großen Teil peripher aus Tetrajodthyronin gebildet (67). Ein Anstieg des T_3/T_4 Verhältnisses vor dem Schlupf ist auf eine Steigerung der Dejodierung zurückzuführen (18).

Die freien Schilddrüsenhormone im Plasma stehen im Gleichgewicht mit den proteingebundenen. Nur das nicht proteingebundene Hormon ist biologisch aktiv. Für den Hormontransport beim Vogel sind hauptsächlich zwei Plasmaproteine zuständig, das Serumalbumin und das Thyroxinbindungspräalbumin. Das beim Säuger anzutreffende hochspezifische Thyroxinbindungsglobulin fehlt dem Vogel. Beim Vogel weisen T_3 und T_4 eine etwa gleich starke Wirksamkeit auf. Dies wird darauf zurückgeführt, daß beide Hormone im gleichen Umfang an das Zytoplamaprotein gebunden werden. Beim Säuger hingegen wirkt T_3 ca. 5 - 7 mal stärker als T_4 (11, 57).

Die Sekretion der Schilddrüsenhormone wird hauptsächlich von dem thyreotropen Hormon kontrolliert, das von der Adenohypophyse ausgeschüttet wird. Es gibt keine deutlichen Befunde, ob dem L-Thyroxinanstieg beim Hühnerembryo um den 10. - 12. Tag ein Anstieg von TSH vorausgeht. Nach Hypophysektomie fiel der Plasmaspiegel von T_4 vom 12. Tag an ab (72). Ebenso ist ungewiß, ob das vom Hypothalamus gebildete TRH parallel zur Thyroxinbildung um den 10. Tag ansteigt (68, 69, 72).

1.4. Wirkungen der Schilddrüsenhormone auf Wachstum und Energiemetabolismus

Die spezifischen Wirkungen der thyreoiden Hormone auf den Entwicklungsprozeß stehen in der Embryogenese im Vordergrund. Diese wachstumsfördernden Effekte lassen sich besonders deutlich bei der Metamorphose der Kaulquappe und beim Vogelembryo aufzeigen (48). Während beim Säuger ein hyperthyreoider Status wegen der Undurchlässigkeit der Plazentarschranke gegenüber Schilddrüsenhormonen nur schwer erzeugt werden kann, läßt sich bei der Kaulquappe bzw. beim Vogel komplikationslos die Metamorphose bzw. der Schlupf durch thyreoide Hormone beschleunigen (2). Unter diesen Umständen kommt es beim Vogel zu einer vorzeitigen Resorption des Dotters, zu einer rascheren Entwicklung des Schlupfmuskels, des Muskulus complexus major, sowie zu einem vorzeitigen Einsetzen der Lungenatmung (22).

Etwa die Hälfte der Entwicklung im Ei jedoch geht ohne die modifizierenden Effekte der Schilddrüsenhormone vonstatten. Dennoch scheint der Embryo in der frühen Entwicklungphase auf exogen zugeführtes Hormon zu reagieren. STOLL et. al. (62) zeigten, daß eine geringe Dosis von 100 ng I-Thyroxin pro Ei vor dem 10. Tag teratogenetisch wirken kann. BEYER (6) beobachtete unter dem Einfluß von exogen zugeführtem L-Thyroxin bereits am 1. Tag der Inkubation einen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs. Außerdem wiesen thyroxinbehandelte Embryonen ab dem 4. Tag ein höheres Gewicht als unbehandelte auf. Dieser Befund konnte von ROMIJN (53) nicht bestätigt werden.

Die Mechanismen, die zur Beschleunigung des Wachstums und Stimulierung der Differenzierung führen, sind weitgehend ungeklärt (65).
Es gibt jedoch sichere Hinweise, daß die entwicklungsfördernde Wirkung der Schilddrüsenhormone im Nukleinsäurestoffwechsel ansetzt, was dann zu einer gesteigertenProteinsynthese führt. Hierfür ist die Bindung der Schilddrüsenhormone an den Kern über spezifische Rezeptoren Voraussetzung. Neueren Erkenntnissen zufolge sind es ganz spezifische Proteine, über die die Beschleunigung von Wachstum und Reifung zustande kommt, wie z. B. das Wachstumshormon, das Erythropoietin, der Nervenwachstumsfaktor und epidermale Wachstumsfaktor (44, 20). Das Wachstumshormon, dessen Synthese von der Anwesenheit von T_3 und Glucokortikoiden abhängig ist, steigert unter anderem die Produktion bzw. die Sekretion der Somatomedine. Diese insulinähnlichen Peptide sind bekanntlich für die Knorpelbildung verantwortlich. Eine Aktivität dieser Stoffe wurde im

Serum von Hühnerembryonen von GASPARD ab dem 13. Tag nachgewiesen (24). T_3 vermag auch direkt die Somatomedinproduktion zu stimulieren.
Erythropoietin, ein in der Niere synthetisiertes Glycoprotein, entfaltet seine Wirkung auf das Wachstum über die Zellreplikation sowie die Differenzierung der Knochenmarksstammzellen zu hämoglobinproduzierenden Proerythroblasten.
Beim Nervenwachstumsfaktor induziert die β-Untereinheit beim 8 Tage alten Hühnerembryo das Wachstum von Neuriten aus dem dorsalen Wurzelganglion.
Schließlich wird für den epidermalen Wachstumsfaktor angenommen, daß er neben Effekten auf verschiedene Zelltypen die Hautreifung fördert (20).

Neben der anabolen Wirkung greifen Schilddrüsenhormone bekanntlich auch in den Energiemetabolismus des Embryos ein. Dies zeigt sich in einem gesteigerten Sauerstoffverbrauch und einer gesteigerten Wärmeentwicklung (6, 47, 54). In diesem Zusammenhang ist interessant, daß die Japanische Wachtel, die wie das Haushuhn zu den Nestflüchtern gehört, in der zweiten Hälfte der Inkubation auf niedrige Umgebungstemperatur mit endogener Wärmeproduktion reagiert (39, 61, 17).
Demgegenüber zeigt die Ringeltaube im Embryonalstadium bei gleichen Bedingungen keine endothermen Reaktionen (38). Dies wird auf eine langsamere Entwicklung der Schilddrüse bei Nesthockern zurückgeführt.

1.5. Hemmung der Schilddrüsenfunktion

Wie eingangs bereits angedeutet wurde, verzögern Thyreostatika die embryonale Entwicklung (9).

Auch dieser Effekt läßt sich besonders deutlich beim Vogelembryo aufzeigen. Die Applikation von Thyreostatika führt zu einer Verlängerung der Inkubationsdauer. Dabei verlangsamt sich, im Gegensatz zum hyperthyreoiden Status, die Resorption des Dottersackes, die Lungenentfaltung sowie die Ausbildung des Schlupfmuskels (52,71). Bei hohen Dosen von Thioharnstoff, eines besonders wirksamen Goitrogens, kann der Schlupf sogar vollkommen verhindert werden. Dies scheint durch die Unterdrückung der Lungenentfaltung verursacht zu sein (25). Untersuchungen über die Auswirkung eines experimentell erzeugten hypothyreoiden Status liegen auch bei Säugetierembryonen vor.
So verursacht Thyroidektomie bei jungen Ratten einen Abfall der Proteinsyntheserate, sowie eine Abnahme an RNA (8). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß Oestradiolbenzoat bei trächtigen Ratten eine antithyreoide Wirkung auf die Embryonen entfaltet (36).

1.6. Die Wirkung von Cycloheximid

Cycloheximid, das aus Streptomyces griseus isoliert wird, wirkt toxisch auf Pilze, Algen und Protozoen, jedoch nicht auf Bakterien.
Die antitumorösen Eigenschaften des Antibiotikums können nicht für klinische Zwecke genutzt werden, da es auf den Säugetierorganismus toxisch wirkt.
Der Einsatz von Cycloheximid zur Bekämpfung von Pilzbefall höherer Pflanzen ist wegen seiner Phytotoxizität eingeschränkt (60).
Die Substanz wird hauptsächlich zu Versuchszwecken in der experimentellen Pathologie eingesetzt (85).

Versuche, die zur Klärung der Wirkungsmechanismen durchgeführt wurden, zeigten, daß Cycloheximid primär in die Proteinsynthese eingreift. Es konnte nachgewiesen werden, daß Cycloheximid die Proteinsynthese von verschiedenen Hefen, von Aspergillus nidulans und von verschiedenen Säugetierzellen hemmt (34, 35, 60).

Es besteht wenig Zweifel, daß die toxischen Effekte des Antibiotikums auf diese Hemmung der Proteinsynthese zurückzuführen sind. Der genaue Wirkungsmechanismus ist jedoch nicht bekannt.

COLOMBO et. al. (12) und TRAKATELLIS et. al. (73) schließen aus ihren Experimenten, daß Cycloheximid möglicherweise die Zusammenlagerung von Monoribosomen verhindert, die die Voraussetzung für die Bindung der Messenger-RNA darstellt. Die an die Träger-RNA gebundenen Aminosäuren könnten so nicht zu Polypeptidketten zusammengelagert werden. Um diese Vermutung zu bekräftigen, sind jedoch noch ausführlichere Untersuchungen nötig.

GARBER et. al. (23) konnten nachweisen, daß Cycloheximid in den Mechanismus des Energietransportes von isolierten Säugetiermitochondrien hemmend eingreift. Jedoch ist die Frage, ob der Effekt auf den Energiemetabolismus unabhängig von der Proteinsynthese gesehen werden kann, noch ungeklärt.

Die Synthese säurelöslicher Nukleotide sowie die der RNA bei Hefe- und Säugetierzellen wird durch Cycloheximid nur nach Langzeitbehandlung negativ beeinflußt. Hingegen wird die DNA-Produktion von Hefezellen und auch die von menschlichen Epidermoid-Karzinomzellen in gleichem Ausmaß wie die Proteinsynthese gehemmt. Möglicherweise ist auch dieser

Effekt als Sekundärerscheinung des Eingriffs in die Proteinsynthese zu beurteilen (60).

1.7. Die Wirkung von Chloramphenicol

Chloramphenicol (CAP) ist ein Pharmakon öffentlichen Interesses geworden, nachdem es in höheren Konzentrationen als Rückstand in Fleisch, Milch und Hühnereiern gefunden wurde (37).

Das sehr effektive Breitbandantibiotikum, das heute synthetisch hergestellt wird, wird in der Veterinärmedizin gegen alle Arten systemischer Infekte verwendet (5). Bei den Haussäugetieren spielen toxische Nebeneffekte kaum eine Rolle. Dagegen sind beim Menschen, bei dem es nur gegen schwere Infektionen wie Thyphus oder Meningitis eingesetzt wird, eine Reihe toxischer Nebenwirkungen bekannt.

CAP kann bei Personen mit genetisch determinierter Prädisposition für die Umwandlung des Antibiotikums zu toxischen Zwischenprodukten zu irreversibler, dosisunabhängiger Knochenmarksaplasie und im Anschluß zu aplastischer Anämie führen. Menschen ohne diese Disposition können an dosisabhängiger reversibler Myelosuppression erkranken (56).

Zudem kann CAP über einen noch ungeklärten Mechanismus hepatozelluläre Gelbsucht erzeugen (85).

Bei Neugeborenen kann eine Behandlung mit CAP das "Grey-Baby-Syndrome" hervorrufen, das auf ein noch unreifes Glucuronidierungsvermögen zurückzuführen ist.

Allergische Effekte sind bei nicht lokaler Behandlung sehr selten. Resistenzerzeugende Wirkungen werden, wegen des vollen Einsatzes in Entwicklungsländern

gehäuft in Mexiko und Asien, beobachtet (37).

Die bakteriostatische Wirkung von CAP kommt über die Hemmung der Proteinsynthese zustande. Es blockiert die Aminosäurentransferaseaktivität, indem es sich mit den 50s-Untereinheiten der 70s-Ribosomen verbindet. Eine Verlängerung der Peptidketten ist dadurch nicht mehr möglich (80).
Die CAP-Konzentration, die nötig ist um bakterielles Wachstum zu hemmen, liegt in der gleichen Größenordnung, die auch die Proteinsynthese an mitochondrialen 70s-Ribosomen von höheren Organismen beeinflußt. Die bei Bakterienribosomen gewonnenen Erkenntnisse über die molekulare Wirkungsweise dieses Antibiotikums gelten mit großer Wahrscheinlichkeit auch für die Mitochondrienribosomen (3, 81).
Effekte von CAP auf die 80s-Ribosomen des Zytoplasmas wurden bisher nicht beobachtet (3, 14, 81).
Ungestörte Mitochondriogenese ist die Voraussetzung für embryonale Entwicklung, besonders während der Organogenesephase. Die Beeinträchtigung essentieller mitochondrialer Prozesse zieht eine drastische Reduktion mitochondrialer Funktion nach sich. So zeigten UEHLIN und BASS (84), daß CAP die Mortalität von Rattenembryonen über die Hemmung mitochondrialer Funktionen induzieren kann.
Darüberhinaus beeinträchtigt CAP den mitochondrialen Stoffwechsel durch die Hemmung der Synthese von Cytochromoxidase. Der Effekt von CAP auf embryonales Gewebe wird dadurch potenziert, daß auf Grund der geringen Mitochondrienzahl auch eine viel geringere Cytochromoxidaseaktivität vorliegt

und dadurch die Atmungskapazität erniedrigt ist (10, 40).
Eine Störung der Energiebereitstellung wirkt sich auch wegen der hohen Mitoserate besonders negativ auf embryonales Gewebe aus. Ein Vergleich der Proteinsynthesekapazität des endoplasmatischen Retikulums zwischen schnell wachsendem Embryogewebe zum Zeitpunkt der Organogenese und Lebergewebe erwachsener Organismen erbrachte jedoch das überraschende Resultat, daß die Rate des Aminosäureeinbaus gleich war (33, 3). WIEDEMANN und BASS (77) erklärten das Phänomen mit einer möglicherweise längeren Halbwertszeit des Embryoproteins.
Speziell für den Hühnerembryo zeigt CILIEVICI (10) eine teratogenetische Wirkung von CAP auf. 36 h nach Beginn der Bebrütung behandelte Embryonen zeigten am 20. Tag eine merkliche Retardierung der Gesamtentwicklung, verschiedene Mißbildungen und Verzögerung der Skelettentwicklung .

Aus den bisherigen Erörterungen geht hervor, daß exogenes L-Thyroxin und Chloramphenicol auf Hühnerembryonen teratogenetisch wirken können. Von Mißbildungen nach Thioharnstoff- und Cycloheximidapplikation wird in der Literatur zwar nicht berichtet, jedoch ist gesichert, daß beide Substanzen nach Überdosierung die Embryosterblichkeit bis zu 100% erhöhen.
Embryotoxische Substanzen führen in vivo dosisabhängig erst zu Entwicklungsverzögerung, dann zu Teratogenität und letztlich zu Embryoletalität.

Bestimmte Beipiele wurden jedoch beschrieben, bei welchen Embryoletalität nicht mit dem Auftreten von Mißbildungen gekoppelt war (3, 74).

1.8. Der Stickstoffmetabolismus des Hühnerembryos

Die Stickstoffbilanz des wachsenden Embryos ist zwar positiv, es fallen aber während der Entwicklung auch stickstoffhaltige Verbindungen an, die ausgeschieden werden. Die Freisetzung des Stickstoffes erfolgt dabei über eine Desaminierungsreaktion in Form von Ammoniak. Da freier Ammoniak als Zellgift wirkt, wurden von den verschiedenen Tierklassen Entgiftungsmechanismen entwickelt. Fische scheiden Ammoniak zu 50% direkt über die Kiemen in das sie umgebende Wasser ab, während beim Säuger NH_3 in Harnstoff überführt wird. Vögel, sowie Insekten und Reptilien entgiften den Ammoniak über Harnsäurebildung.
Diese vollzieht sich im Rahmen der Purinkörpersynthese ausgehend von Glutamat bzw. Glutamin.
Im Reaktionsverlauf der Purinsynthese stellt die Phosphoribosylpyrophosphattransaminase einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar, die die Bildung von 5-Phosphoribosylamin katalysiert. Zu bemerken ist, daß die Purinsynthese gleichzeitig im Dienste des Nukleinsäureaufbaus steht. Umgekehrt stellt das Puringerüst auch das Abbauprodukt der Nukleinsäuren dar, die in Form von Harnsäure ausgeschieden werden.
Die Bildung der Harnsäure vollzieht sich hauptsächlich in der Leber und in der Niere. Interessant ist, daß beim Vogelembryo die Xanthindehydrogenase in der Leber kaum vorhanden ist und erst in der Zeit des

Schlupfes sprunghaft ansteigt. Offensichtlich kommt diesem Organ während der Embryogenese keine besondere Funktion in der Harnsäurebildung zu.
Im Gegensatz zur Leber weist die Niere bereits während der embryonalen Phase eine deutliche Aktivität der Xanthindehydrogenase auf. Im Metanephros steigt die katalytische Kapazität ab dem 12. Tag und im Mesonephros ab dem 5. Tag deutlich an. Die Zunahme der Xanthindehydrogenase im Mesonephros vollzieht sich parallel zur embryonalen Harnproduktion (7, 21).

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß durch Behandlung mit Thioharnstoff, L-Thyroxin oder Cycloheximid die Harnsäurebildung der Leber gegen Ende der Embryogenese stimuliert werden kann (7, 21). Inwieweit diese Substanzen bereits zu einem früheren Zeitpunkt der Entwicklung einen Einfluß auf die Harnsäurebildung ausüben, ist nicht bekannt. Diese Fragestellung war daher Gegenstand der vorliegenden Arbeit.
In diesem Zusammenhang wurde die Ausscheidung der Harnsäure in die Allantoisflüssigkeit verfolgt.

1.9. Entstehung und Funktion der Allantois beim Hühnerembryo

Die Allantois stellt das Auffangbecken des embryonalen Harns dar. Sie wächst beim Hühnerembryo am 3. Tag der Inkubation als Aussackung der Kloake durch die Nabelpforte in das Exozoel ein. Der Harn der funktionsfähigen Urniere, die die rudimentäre Vorniere am 4. Tag ablöst, fließt über den Wolff'schen Gang in den sich entwickelnden Allantoissack. Vom Meta-

nephros, welcher die bleibende Niere beim erwachsenen Vogel darstellt, wird die Ausscheidungsfunktion um den 11. Tag übernommen (41, 45, 46).
Die Allantoisflüssigkeit, das stickstoffhaltige Exkretionsprodukt des Embryos, enthält als Hauptausscheidungsprodukt Harnsäure und eine geringe Konzentration Ammoniak und Harnstoff (45, 51).
Da zu keinem Zeitpunkt der Entwicklung ein vollständiger Harnstoffzyklus vorhanden ist - es fehlt die Ornithin in Arginin verwandelnde Carbamylphosphatsynthetase - kann Harnstoff nur aus exogenem Arginin hergestellt werden. Davon leitet sich wahrscheinlich der in der Allantois enthaltene Harnstoff ab.
Möglicherweise bildet sich Harnstoff auch aus dem Abbau der Harnsäure. Die hierfür nötigen Enzyme wurden jedoch noch nicht eindeutig nachgewiesen (22).
Das Volumen der Allantoisflüssigkeit erreicht mit 6 - 7 ml am 13. Tag das Maximum. Danach erfolgt die Ausschleusung von Wasser mit Hilfe eines aktiven Na^+ Cl^--Transports durch die Zellen des Allantoisendoderms in den Allantoiskreislauf. Trotz dieser Wasserabnahme fällt die Osmolarität im Urin.
Dies ist auf ausfallende Harnsäuremoleküle als Ammoniumurat zurückzuführen. Die abnehmende Resorption von Wasser und Ionen führt zu einer Degeneration der Allantois um den 18. Tag (51).
Neben der Funktion als "embryonale Harnblase" dient die Allantois dem O_2- und CO_2-Austausch sowie der Aufnahme von Salzen aus der Eischale, was sich über die Allantoisgefäße vollzieht. Wie früher fälschlicherweise angenommen wurde, wird das Eiklar nicht über den Allantoiskreislauf zugeführt (83).

2. Zielsetzung

Wie der einleitenden Erörterung zu entnehmen ist, beginnt die Hormonproduktion der Schilddrüse des Hühnerembryos ab dem 10. Tag der Bebrütung und greift ab diesem Zeitpunkt offensichtlich fördernd in Wachstum und Entwicklung ein. Vor diesem Zeitpunkt gibt es widersprüchliche Befunde über die Wirkung intraoval applizierten L-Thyroxins und Thioharnstoffs (6, 53, 54).

In der vorliegenden Arbeit soll im 1. Abschnitt untersucht werden, inwieweit exogenes L-Thyroxin und Thioharnstoff bereits vor dem Einsetzen der Schilddrüsenfunktion wirksam sind.
Wie eingangs ausgeführt, wirken L- Thyroxin und Thioharnstoff fördernd bzw. hemmend auf die Proteinsynthese. Es lag daher nahe, die Effekte von L-Thyroxin und Thioharnstoff mit Verbindungen, die hemmend auf die Proteinsynthese einwirken zu vergleichen. Hierfür wurden die Antibiotika Cycloheximid und Chloramphenicol eingesetzt.

Im Gegensatz zu der frühen Phase der Embryonalentwicklung von Hühnerembryonen ist in der Endphase, kurz vor dem Schlupf, die Wirkungsweise von intraoval appliziertem L-Thyroxin bekannt. Thioharnstoff ist ebenfalls im Hinblick auf seine Wirkungsweise überprüft worden. Allerdings wurde bei den Untersuchungen nur eine geringe Dosis von Thioharnstoff eingesetzt, die den

Schlupf nur unbeträchtlich verzögerte. Von höheren Dosen dieses Thyreostatikums ist zwar bekannt, daß sie den Schlupfzeitpunkt beträchtlich hinauszögern oder überhaupt verhindern, es wurden jedoch noch keine eingehenden Untersuchungen angestellt.
Ziel der Untersuchungen war es daher, die Auswirkungen von hohen Dosen Thioharnstoffs auf die Entwicklung in der späten Phase der Embryogenese zu untersuchen. Dabei wurden auch die Antibiotika Cycloheximid und Chloramphenicol vergleichend eingesetzt.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Versuchstiere

Die Experimente wurden an Hühnerembryonen der Rasse Weißes Leghorn (Versuchsgut Heinrichsruh, LSL) und Braunes Leghorn (Geflügelhof Lohfeld bei Dachau) durchgeführt.
Die Bebrütung erfolgte im Institut bei einer Temperatur von 37° - 38°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 63 - 67%.

3.1.2. Reagentien

Die Reagentien wurden von folgenden Herstellerfirmen bezogen:

- Enzyme, Coenzyme, Harnsäuretest Uricaquant R, Cholesterintest Cholesterol R	Fa. Boehringer
- Oxiluma R	Fa. Baker
- Combustaid R	Fa. Packard
-Quickszins R	Fa. Zinser
- alle übrigen Reagentien	Fa. Merck

L-Thyroxin wurde dankenswerter Weise von der Firma Henning, Berlin, kostenlos zur Verfügung gestellt.

3.1.3. Untersuchungen an Hühnerembryonen der frühen Entwicklungsphase

3.1.3.1. Applikation der Substanzen

Bei der Applikation der Substanzen kurz vor der Bebrütung stellte sich die Frage, in welches Eikompartiment sie erfolgen soll.
Bei Injektion in den Dotter bestand die Gefahr, daß sich die Resoption über einen zu langen Zeitraum erstreckt. Eine Applikation in das Eiklar kam nicht in Frage, weil dessen wäßrige Bestandteile nur langsam und dessen proteinhaltige erst um den 13. Tag der Bebrütung resobiert werden.
Es wurde daher die Luftkammer gewählt. Die verabreichte Substanz erreicht hierbei den Embryo unmittelbar, da die Keimscheibe bei aufrechter Stellung in der Regel direkt unter der Luftkammer liegt und außerdem die Amnionabfaltung erst am 5. Tag abgeschlossen ist (45).
Außerdem wird bei dieser Methode die innere Eihaut nicht eröffnet, was Infektionen und Verletzungen verhindert. Nach KAICK und GRÖTTLER (30) soll die Diffusion der gelösten Substanzen durch die Eihaut nach wenigen Stunden abgeschlossen sein.
Bei der Applikation wurde in folgender Weise verfahren:
Die gelösten Substanzen wurden vor Beginn der Inkubation mittels einer Tuberkulinspritze durch die Eischale in die Luftkammer appliziert. Die Einstichstelle wurde mit einem Kleber verschlossen. Sodann wurden die Eier mit der Luftkammer nach oben 24 h bebrütet. Anschließend wurden sie in die übliche waagrechte Position gebracht.

Folgende Substanzmengen wurden pro Ei appliziert:

Thioharnstoff, 0.5 mg gelöst in 0.1 ml Aqua dest.
L-Thyroxin, 0.006 mg gelöst in 0.1 ml Aqua dest.
Cycloheximid, 0.0025 mg gelöst in 0.1 ml Aqua dest.
Chloramphenicol, 0.25 mg gelöst in 0.1 ml Aqua dest. und 0.013 ml absolutem Äthylalkohol
H^3-Glutaminsäure, 0.6 μCi gelöst in 0.2 ml Krebspuffer

3.1.3.2. Bestimmung der Glutamatdehydrogenase, EC 1.4.1.3.

Nach der Entnahme der Embryonen aus dem Ei wurde mit Zellstoff die anhaftende Flüssigkeit entfernt und anschließend das Feuchtgewicht bestimmt. Sodann wurden die Hühnerembryonen mit 4 Teilen eiskaltem Saccharosepuffer (Saccharose 0.25 mol/l, $MgCl_2$ 1 mmol/l) versetzt, mit Hilfe des Ultraturrax (Fa. Janke und Kunkel, Staufen im Breisgau) 2 × 15 sec homogenisiert und in der Kühlzentrifuge zentrifugiert (10 min, 12000×G/min, 4°C). Im Überstand wurde die Aktivität der Glutamatdehydrogenase nach der Methode von OLSON und ANFINSON (43) bestimmt. Dabei diente das verbrauchte NADH als Meßgröße. Der Proteingehalt des Überstandes wurde nach der Biuretmethode, modifiziert nach GUDER et. al., ermittelt.

3.1.3.3. Bestimmung der Phosphoribosylpyrophosphattransaminase, EC 2.4.2.14

Die Embryonen wurden mit 4 Teilen eiskaltem Saccharosepuffer (Saccharose 0.25 mol/l, $MgCl_2$ 1mmol/l) versetzt und mit dem Potter homogenisiert. Die Zer-

kleinerung bereitete bis zum Alter von 10 Tagen keine Schwierigkeiten. Das Homogenat wurde zentrifugiert (30 min, 13000×g/min, 4°C) und der Überstand dekantiert.
200 µl des Überstandes wurden mit 1 ml wäßriger Lösung aus Phosphoribosylpyrophosphat (5 mmol/l), Glutamin (2 mmol/l), $MgCl_2$ (15 mmol/l) und NaF (1 mmol/l) inkubiert (30 min, 37°C).
Weitere 200 µl des Überstandes wurden mit der gleichen Lösung, die jedoch kein Phosphoribosylpyrophosphat enthielt, in der gleichen Weise inkubiert. Danach wurden beide Ansätze durch Kochen (6 min) gestoppt und der nach Zentrifugation (2 min, 10000×g/min) erhaltene Überstand zur Glutamatbestimmung nach BERNT und BERGMEIER (4) eingesetzt.
Die Aktivität der Phosphoribosylpyrophosphattransaminase wurde aus der Differenz zwischen den beiden Glutamatwerten der Ansätze mit und ohne Phosphoribosylpyrophosphat errechnet.

3.1.3.4. Bestimmung der Einbaurate von radioaktivmarkierter Glutaminsäure in embryonales Protein

Der Einbau von isotopenmarkierter Glutaminsäure in das embryonale Protein wurde bei Kontrollen und thioharnstoffbehandelten Tieren untersucht.
Am 4. Tag der Bebrütung wurde tritiummarkierte Glutaminsäure (0.6 µCi), gelöst in 200 µl Krebspuffer in die Luftkammer appliziert. Die Embryonen wurden dann jeweils am 7. - 10. Tag der Bebrütung entnommen, mit 4 Teilen Saccharosepuffer (Saccharose 0.25 mol/l, $MgCl_2$ 1 mmol/l) versetzt und gepottert.

4 ml des Homogenats wurden für die Zentrifugation abpipettiert. Die Zellkernfraktion wurde nach Zentrifugation bei 1000 × g (15 min, 4°C) erhalten. Der entstandene Überstand wurde nochmals zentrifugiert (15 min, 10000 × g, 4°C). Der hierbei erhaltene Niederschlag stellte die Mitochondrien- und der Überstand die Zytoplasmatische Fraktion dar. Die Fraktionen wurden jeweils mit Saccharosepuffer auf 5 ml aufgefüllt und gründlich durchmischt. Davon wurden Doppelproben für die Proteinbestimmung entnommen.

Das Protein der 3 Fraktionen wurde nach Zugabe von 0.5 ml 30%iger Perchlorsäure zur Ausfällung gebracht und durch Zentrifugation (30 min, 20000 × g, 4°C) vom wäßrigen Überstand abgetrennt. Der Bodensatz wurde nun vollständig mit Hilfe eines kleinen Metallspatels und wenig gebleichten Zellstoffs dem Zentrifugenröhrchen entnommen, in weißen Zellstoff gewickelt und bis zur Verbrennung im Oxidizer (Fa. Packard) tiefgefroren.

Das Prinzip der Oxidizermethode besteht darin, daß bei der Verbrennung isotopenmarkierten Materials sich die radioaktiven Anteile, in diesem Fall Tritium, verflüchtigen und von Wasserdampf abgefangen werden. Der radioaktive Wasserdampf kondensiert, wird in Zählfläschchen (Fa. Packard) aufgefangen und vermischt sich anschließend mit 10 ml klarer Szintillationsflüssigkeit (Oxiluma ^{R}). In Anwesenheit von 150 µl Verbrennungshilfe (Combustaid ^{R}) war die vollständige Verbrennung nach 1.5 min abgeschlossen. 1 h nach Füllung der Zählfläschchen wurde die Impulszahl pro min im Szintillationszähler (Fa. Packard) bestimmt.

Orientierende Versuche zeigten, daß die Impulszahl nicht konstant blieb, wenn der gefällte Proteinniederschlag mit Triton (1%ig) und Natronlauge (30%ig) wieder in Lösung gebracht wurde. Dies ist offensichtlich darauf zurückzuführen, daß das gelöste Protein mit der Szintillationsflüssigkeit (Quickszins ^{R}) keine stabile Lösung ergab. Im Gegensatz hierzu blieb die Impulszahl bis mindestens 24 h konstant, wenn die Proben mit Hilfe der Oxidizermethode aufbereitet wurden.

3.1.3.5. Bestimmung der ATP-, ADP- und AMP-Konzentration

Die Hühnerembryonen wurden möglichst schnell dem Ei entnommen, dekapitiert und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, um eine Verminderung der Metabolitenkonzentration möglichst gering zu halten. Pro Analyse wurden je nach Größe 1 - 3 Embryonenrümpfe im vorgekühlten Mörser zu Pulver zerrieben, gewogen und in 4 Teilen 6%iger $HClO_4$ aufgenommen. Nach Zerkleinerung mit dem Ultraturrax (2×15 s) wurde das Homogenat zentrifugiert (15 min, 15000× g, 4°C). Der Überstand wurde im Eisbad aufbewahrt, während der Niederschlag mit der gleichen Menge 3%iger $HClO_4$ suspendiert und nochmals zentrifugiert wurde (15 min, 15000× g, 4°C). Aus den vereinigten Überständen wurde nach Neutralisation mit Kaliumhydrogencarbonat die Konzentration von ATP, ADP und AMP nach JAWOREK et. al. (28, 29) bestimmt.

3.1.3.6. Bestimmung der Harnsäure-, Inosin-, Hypoxanthin-, und Xanthin-Konzentration in der Allantois-flüssigkeit

Nachdem die Luftkammer des Eies eröffnet und die Eihäute vorsichtig entfernt worden waren, wurde die Allantois mit einer dünnen Kanüle angestochen und daraus ca. 1 ml Flüssigkeit entnommen. Davon wurden 0.1 ml 1 : 10 mit Aqua dest. verdünnt und 0.5 ml zur Bestimmung in den enzymatischen Farbtest für Harnsäure, Urica-quant ^{R}, eingebracht.
Das Prinzip dieser Uricase-Katalase-Methode beruht darauf, daß Wasserstoffperoxid, welches beim Abbau von Harnsäure zu Allantoin entsteht, Methanol unter dem Einfluß von Katalase zu Formaldehyd oxidiert. Dieses lagert sich mit Acetylaceton und Ammoniak zu 3,5-Diacetyl-1,4-dihydrolutidin zusammen, einem farbigen Komplex, der bei 405 nm gemessen wird.
Weitere 50 µl der Allantoisflüssigkeit wurden für die Bestimmung von Xanthin, Hypoxanthin und Inosin mit Hilfe der High-Pressure-Liquid-Chromatography eingesetzt. Diese erfolgte mit dem Umkehrphasen-Hochdruck-Flüssigkeit-Chromatographie-System (HPLC), bestehend aus einer Pumpe (Modell 6000 A), einem UV - Detektor mit variabler Wellenlänge (Modell 450) und einem Einspritzsystem (Modell U 6 - k), alle von Waters Associates, Königstein/Ts. Die Säule, die eine Länge von 300mm aufwies, war bepackt mit dem Umkehrphasen-Material Bondapak C 18 (Waters Associates).
Als Eluationsmittel wurde eine Ammoniumhydrogenphosphatlösung (0.01 mol/l, pH 4.7) verwendet. Nach dem Ansetzen wurde der Puffer durch einen

Membranfilter (Type HA) mit einer Porengröße von 0.45 µm (Millipore Corp., Bedford, Mass.) filtriert und anschließend für 3 min im Unterdruck entgast. Die Flußrate war 1.0 ml/min. Zur Bestimmung der Nukleinsäuremetaboliten wurde der UV - Detektor auf eine Wellenlänge von 254 nm eingestellt und 15 min nach dem Einspritzen der Probe auf 262 nm geändert.

3.1.4. Untersuchungen an Hühnerembryonen der späten Entwicklungsphase

3.1.4.1. Applikation der Substanzen

Die Substanzen wurden, wie auf Seite 19 beschrieben, in die Luftkammer appliziert. Für Versuche, die am 17. Tag unternommen wurden, wurden die Stoffe am 14. Tag, für die am 18. - 20. (bzw. 21.) Tag, am 17. Tag der Bebrütung injiziert.
Von einer Injektion von Kochsalzlösung bei Kontrollembryonen wurde abgesehen, da frühere Versuche keine Hinweise ergaben, daß die Applikation als solche Auswirkungen auf den Embryo hat (75).

Folgende Substanzmengen wurden pro Ei appliziert:

Thioharnstoff, 2.5 mg gelöst in 0.2 ml Aqua dest.
Cycloheximid, 0.005 mg gelöst in 0.2 ml Aqua dest.
Chloramphenicol, 0.25 mg gelöst in 0.2 ml Aqua dest. und 0.013 ml absolutem Äthylalkohol

3.1.4.2. Bestimmung von Gewichtsparametern

Von den behandelten Eiern wurde das Gesamtgewicht sowie das Gewicht des Embryos bestimmt. Aus der Differenz aus Gesamtgewicht und Embryogewicht errechnete sich das jeweilige Resteigewicht.
Vor der Bestimmung des Lebergewichtes wurde die Gallenblase entfernt.

3.1.4.3. Bestimmung der Phosphoribosylpyrophosphattransaminase, EC 2.4.2.14, im Leberhomogenat

Die eine Hälfte der Leber wurde für die Bestimmung der Phosphoribosylphosphattransaminaseaktivität eingesetzt, die andere Hälfte wurde für die Leberfarbstoff- und Cholesterinmessung tiefgefroren. Die Aufbereitung der Probe sowie die Enzymbestimmung in der Leber wurde analog der auf Seite 20 beschriebenen Methode durchgeführt.

3.1.4.4. Bestimmung des "Leberpigmentes" und des Cholesterins

Das Leberpigment, das im wesentlichen aus carotinoiden Substanzen besteht, wurde nach einer von WEISS (45) durchgeführten Methode bestimmt. Hierbei wurden lipidlösliche Substanzen mit einem Methanol/Chloroformgemisch (1 : 3) aus dem Leberhomogenat extrahiert. Anschließend wurde der Auszug mit dem Lösungsmittel auf 10 ml aufgefüllt und durchmischt. 1 ml des Extraktes wurde für die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 463 nm entnommen.

Der restliche Extrakt wurde bei 50°C abgedampft und der Rückstand in 2 ml Isopropylalkohol wieder aufgenommen. 10 µl dieser Lösung wurden zur Cholesterinbestimmung mit 1.5 ml Cholesterinreagenz (Cholesterol ^{R}) versetzt. Nach 10 min konnte die Intensität des gebildeten Farbkomplexes bei einer Wellenlänge von 546 nm gegen das reine Reagenz gemessen werden.

3.1.4.5. Bestimmung der Glucose und Glykogenkonzentration in der Leber

Die embryonale Leber wurde nach Entfernung der Gallenblase sofort in flüssigen Stickstoff getaucht. Das Gewebe wurde im Mörser zu Pulver zerrieben und mit 4 Teilen Perchlorsäure (6%ig) versetzt. Nach Homogenisierung im Ultraturrax (2 x 15 sec) und Zentrifugation (15 min, 15000 x g, 4°C) wurde der Überstand der Probe bei 4°C aufbewahrt. Der Bodensatz wurde mit der gleichen Menge 3%iger Perchlorsäure suspendiert und ein zweites Mal unter den oben angegebenen Bedingungen zentrifugiert.
Die vereinigten Überstände wurden nach Neutralisation mit Kaliumhydrogencarbonat direkt für die Glucosebestimmung eingesetzt, die nach der Hexokinase-Glucose-6-Phosphatdehydrogenase-Methode (32) erfolgte.

Da sich Glykogen im Überstand und auch im Niederschlag verteilte, wurden beide Fraktionen hinsichtlich ihres Glykogengehaltes untersucht. Dabei wurde einmal der neutralisierte Überstand mit Acetatpuffer und Amyloglucosidase versetzt. Zum anderen wurde der auf pH 4 - 5 eingestellte Niederschlag in Acetatpuffer suspendiert und anschließend ebenfalls mit Amyloglucosidase vermischt. Im Schüttelbad wurden beide Ansätze inkubiert (37°C), nach 2 h mit 30%iger Perchlorsäure gestoppt, neutralisiert, zentrifugiert (2 min, 10000 x g) und die entstandene Glucose mit der oben genannten Methode bestimmt.

3.1.5. Statistische Berechnung

Die Werte, die in den Tabellen angegeben sind, sind Mittelwerte ($\bar{x}$) mit den jeweiligen Standardabweichungen ($\pm$ s).
Die Anzahl der Versuche ist in Klammern aufgeführt (n). Mit Hilfe des U - Tests von WILCOXON, MAN und WHITNEY (55), der den Vergleich zweier unabhängiger Stichproben ermöglicht, wurde die Signifikanz ermittelt.

3.2. Ergebnisse der Untersuchungen der frühen Entwicklungsphase

3.2.1. Beeinflussung des Wachstums und des Proteinstoffwechsels

Vor Beginn der Inkubation wurden L-Thyroxin, Thioharnstoff sowie Chloramphenicol und Cycloheximid, wie in "Material und Methoden" beschrieben, in die Luftkammer befruchteter Eier appliziert und das Gewicht der behandelten sowie das der unbehandelten Embryonen von 7. - 10. Tag bestimmt. Wie Tab. 1 zu entnehmen ist, betrug der Gewichtsanstieg bei den Kontrollen pro Tag etwa 0.5 g. Auch die behandelten Embryonen steigerten ihr Gewicht kontinuierlich. Jedoch waren die mit L-Thyroxin applizierten Tiere verglichen mit gleichaltrigen Kontrollen am 9. Tag signifikant schwerer. Am 10. Tag war die erhöhte Gewichtszunahme nur noch angedeutet. Im Gegensatz dazu wiesen die mit dem Thyreostatikum behandelten Embryonen während des gesamten Untersuchungszeitraumes ein deutlich geringeres Gewicht auf. Unter dem Einfluß von Cycloheximid war die Wachstumsverzögerung ähnlich der der thioharnstoffbehandelten Tiere. Chloramphenicol verursachte nur bis zum 8. Tag eine statistisch gesicherte Gewichtsverzögerung.

Tab. 1: Der Einfluß der applizierten Substanzen auf das Embryofeuchtgewicht

d:	7	8	9	10
	Feuchtgewicht (g)			
Kontrolle	0.67 ± 0.16 (14)	1.01 ± 0.15 (10)	1.42 ± 0.20 (8)	2.18 ± 0.50 (9)
Thyroxin	0.60 ± 0.09 (6)	0.98 ± 0.11 (6)	1.72 ± 0.07^{x} (6)	2.29 ± 0.01 (6)
Thioharnstoff	0.41 ± 0.05 (7)	0.60 ± 0.08^{xxx} (7)	0.96 ± 0.26^{xx} (7)	1.56 ± 0.41^{xx} (7)
Cycloheximid	0.48 ± 0.10^{x} (6)	0.76 ± 0.18 (8)	1.16 ± 0.33^{x} (7)	1.47 ± 0.35^{xx} (7)
Chloramphenicol	0.50 ± 0.13^{x} (8)	0.77 ± 0.15^{xx} (9)	1.27 ± 0.20 (8)	1.87 ± 0.38 (9)

d = Bebrütungstag
Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben,

Vergleich mit gleichaltrigen Kontrollen:

x = $p < 0.05$
xx = $p < 0.01$
xxx = $p < 0.001$

Da die Thioharnstoffapplikation die deutlichsten Effekte auf das Wachstumsgeschehen zur Folge hatte (Tab. 1), wurden deren Auswirkung auf den Proteingehalt in den einzelnen Zellkompartimenten untersucht (Tab. 2). Dabei zeigte sich, daß die Werte vom 7./8. bis zum 9./10. Tag der Inkubation bei den Kontrollen wie auch bei den thioharnstoffbehandelten Embryonen deutlich anstiegen. Unter dem Einfluß von Thioharnstoff war der Proteingehalt der Zellkerne, der Mitochondrien und des Zytoplasmas gegenüber den Kontrollen in der Regel geringer, jedoch nicht in einem signifikanten Ausmaß. Für das Gesamtprotein wurden nach Thioharnstoffbehandlung im Vergleich zu den Kontrollen am 9./10. Tag deutlich geringere Gehalte nachgewiesen.

Im Folgenden wurde untersucht,
ob thyreostatisch behandelte Embryonen in vivo weniger radioaktivmarkierte Aminosäure in das Protein der Zellkompartimente einbauen als Kontrollembryonen (Tab. 3 und 4). Wurde tritiummarkierte Glutaminsäure am 4. Tag in das Ei appliziert, so erhöhte sich die Gesamtradioaktivität im Protein vom 7./8. bis zum 9./10 Tag sowohl bei den Kontrollen als auch bei den thioharnstoffbehandelten Tieren. Ähnlich wie bei der Proteinkonzentration der einzelnen Kompartimente war auch die Impulszahl unter dem Einfluß von Thioharnstoff im Vergleich zu den Kontrollen geringer. Auch dieser Unterschied ließ sich statistisch nicht sichern (Tab. 3).

Berechnet man die Impulszahl mit der Proteinkonzentration der einzelnen Zellbestandteile (Tab. 4), so fällt auf, daß sowohl nach Thioharnstoffapplikation als auch bei den Kontrollen vom 7./8. bis 9./10. Tag der Inkubationszeit im Falle der Zellkerne eine geringgradige Abnahme, und im Falle der Mitochondrien eine mehr oder weniger deutliche Zunahme der Impulszahl zu verzeichnen war. Die Impulszahl des Zytoplasmas blieb in etwa gleich.
Da die Proteinsynthese und das Wachstum von energiereichen Phosphaten abhängen, wurde in abschließenden Versuchen die Konzentration an Adenonukleotiden im Embryohomogenat bestimmt (Tąb. 5). Es konnten im untersuchten Zeitraum keine deutlichen Unterschiede zwischen Kontrollen und behandelten Tieren festgestellt werden.

Tab. 2: Der Effekt von Thioharnstoff auf den Proteingehalt von Zellkernen, Mitochondrien und Zytoplasma

	Zellkerne		Mitochondrien		Zytoplasma		Gesamtprotein	
	mg Protein/g Embryofeuchtgewicht							
d	K	T	K	T	K	T	K	T
7-8	25.64±4.27 (8)	23.41±4.45 (8)	6.40±2.06 (8)	5.73±1.36 (8)	11.08±1.67 (8)	10.30±1.32 (8)	43.12±7.36 (8)	39.44±6.27 (8)
9-10	34.17±2.71 (8) xx	28.09±3.06 (8) x	9.03±1.52 (8) x	9.15±1.30 (8) xxx	13.29±1.72 (8) x	13.02±1.65 (8) xxx	56.50±3.87 (8) xx	50.26±3.72 (8) oo xx

K = Kontrollen
T = Thioharnstoff
d = Bebrütungstage
Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.

Vergleich mit gleichaltrigen Kontrollen:
oo = $p < 0.01$

Vergleich mit 7. - 8. Tag
x = $p < 0.05$
xx = $p < 0.05$
xxx = $p < 0.001$

Tab. 3: Der Einfluß von Thioharnstoff auf den in vivo - Einbau von H^3 - Glutaminsäure in das Protein von Zellkernen, Mitochondrien und Zytoplasma bezogen auf das embryonale Feuchtgewicht

Impulse/min x mg Protein x g Embryofeuchtgewicht

d	Zellkerne K	Zellkerne T	Mitochondrien K	Mitochondrien T	Zytoplasma K	Zytoplasma T
7 - 8	9338 ± 1956 (8)	7669 ± 2080 (9)	653 ± 332 (8)	485 ± 201 (9)	2220 ± 659 (8)	1783 ± 414 (8)
9 - 10	16460 ± 4987 (8) xx	12990 ± 4611 (6) xx	1674 ± 614 (8) xx	1577 ± 582 (6) xx	4216 ± 1388 (8) xxx	4045 ± 1530 (6) xx

K = Kontrollen
T = Thioharnstoff
d = Bebrütungstage
Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.

Vergleich mit 7. - 8. Tag:
xx = $p < 0.01$
xxx = $p < 0.001$

Tab. 4: Der Einfluß von Thioharnstoff auf den in vivo - Einbau von H^3 - Glutaminsäure in das Protein von Zellkernen, Mitochondrien und Zytoplasma

	Zellkerne		Mitochondrien		Zytoplasma	
	Impulse/min x mg Protein/g Embryofeuchtgewicht					
d	K	T	K	T	K	T
7 - 8	10106 ± 2670 (8)	9074 ± 1340 (9)	660 ± 224 (8)	581 ± 131 (9)	2354 ± 559 (8)	2158 ± 394 (8)
9 - 10	9128 ± 3284 (8)	7657 ± 2236 (6)	895 ± 271 (8)	914 ± 256 (6) xx	2359 ± 529 (8)	2355 ± 683 (6)

K = Kontrollen
T = Thioharnstoff
d = Bebrütungstage
Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.

Vergleich mit 7. - 8. Tag:
xx = $p < 0.01$

Tab. 5: Der Einfluß der applizierten Substanzen auf den Adenonukleotidgehalt im embryonalen Gewebe

d:	7 - 10		
	ATP	ADP	AMP
	µmol/g Embryofeuchtgewicht		
Kontrollen	1.87 ± 0.23 (6)	0.31 ± 0.32 (5)	0.20 ± 0.13 (5)
Thioharnstoff	1.89 ± 0.07 (5)	0.29 ± 0.15 (4)	0.19 ± 0.17 (4)
Cycloheximid	1.79 ± 0.27 (6)	0.40 ± 0.16 (5)	0.23 ± 0.10 (5)

d = Bebrütungstage
Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.

3.2.2. Beeinflussung von Enzymaktivitäten

Im Folgenden wurde untersucht, ob die applizierten Substanzen einen Einfluß auf die spezifischen Aktivitäten der Glutaminsynthetase, der Glutamatdehydrogenase (Tab. 6) und der Phosphoribosylpyrophosphattransaminase (Tab. 8) aus-

üben. Diese Enzyme sind am Aufbau des Puringerüstes beteiligt, der, wie bereits erwähnt, im Dienste der Stickstoffausscheidung steht. Dabei zeigte sich, daß die Aktivität der Glutaminsynthetase (EC 6.3.1.2.) nicht für eine Messung nach der Methode von ELLIOT (19) ausreichte.

Wie Tab. 6 zeigt, veränderte sich die spezifische Aktivität der Glutamatdehydrogenase bei den Kontrollen vom 7. bis 10. Tag der Inkubation nur geringgradig. Demgegenüber lösten die applizierten Substanzen, mit Ausnahme von Thioharnstoff, eine signifikante Zunahme der spezifischen Aktivität der Glutamatdehydrogenase vom 7. bis 10. Tag der Bebrütung aus. Diese war besonders deutlich unter dem Einfluß von L-Thyroxin. Nach Thioharnstoffbehandlung hingegen war eine deutliche Verringerung der Aktivitätszunahme zu beobachten.
Vergleicht man nun die Proteinkonzentration (Tab. 7), die als Bezugsgröße für die spezifische Aktivität der Glutamatdehydrogenase diente, mit der Aktivitätsänderung dieses Enzyms (Tab. 5), so fällt auf, daß sowohl bei den Kontrollen als auch bei den behandelten Embryonen die Proteinkonzentration vom 7. bis zum 10. Tag deutlich zunahm. Die Proteinwerte waren nach Einfluß von Cycloheximid durchgehend und zum Teil signifikant niedriger als die der Kontrollen.
Bei der Bestimmung der spezifischen Aktivität der Phosphoribosylpyrophosphattransaminase (Tab. 8) konnte weder bei den Kontrollen noch unter dem Einfluß von Thioharnstoff bzw. Cycloheximid eine Veränderung beobachtet werden.

Tab. 6: Der Einfluß der applizierten Substanzen auf die Aktivität der Glutamatdehydrogenase im Gesamtembryohomogenat

d:	7	8	9	10
	mE/mg Protein			
Kontrolle	16.41 ± 2.26 (6)	17.77 ± 6.03 (6)	17.25 ± 4.97 (6)	22.80 ± 6.57 (6)
Thyroxin	17.92 ± 1.72 (6)	21.55 ± 3.98 (6)	29.17 ± 1.73^{xx} (6)	31.78 ± 2.99^{x} (6)
Thioharnstoff	14.19 ± 1.98 (6)	11.97 ± 1.58 (6)	13.28 ± 6.63^{x} (6)	18.60 ± 2.96 (6)
Cycloheximid	17.20 ± 1.50 (6)	11.45 ± 1.57 (6)	13.38 ± 1.65 (6)	26.87 ± 5.31 (6)
Chloramphenicol	17.53 ± 3.03 (6)	21.67 ± 3.54 (6)	24.42 ± 2.77^{x} (6)	26.67 ± 4.67 (6)

1 mE $\hat{=}$ Bildung von 1 nmol NADH/min bei 37° C
d = Bebrütungstage
Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben

Vergleich mit gleichaltrigen Kontrollen:
x = $p < 0.05$
xx = $p < 0.01$

Tab. 7: Der Einfluß der applizierten Substanzen auf den Proteingehalt im Überstand zentrifugierten Embryohomogenats

d:	7	8	9	10
	mg Protein/g Embryofeuchtgewicht			
Kontrolle	13.17 ± 4.44 (7)	20.41 ± 2.88 (7)	22.95 ± 2.85 (6)	26.52 ± 2.24 (6)
Thyroxin	16.64 ± 1.18 (6) x	19.61 ± 2.24 (6)	21.99 ± 1.54 (7)	25.39 ± 1.34 (7)
Thioharnstoff	18.29 ± 3.75 (7) x	15.86 ± 1.00 (6) xx	22.81 ± 0.63 (7)	29.31 ± 2.39 (7)
Cycloheximid	12.50 ± 2.23 (6)	15.74 ± 2.03 (7) xx	17.86 ± 1.16 (7) xxx	22.45 ± 2.60 (7) x
Chloramphenicol	16.85 ± 3.60 (6)	18.87 ± 2.39 (6)	22.63 ± 1.54 (6)	23.54 ± 2.60 (6)

d = Bebrütungstag
Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.

Vergleich mit gleichaltrigen Kontrollen:
x = $p < 0.05$
xx = $p < 0.01$
xxx = $p < 0.001$

Tab. 8: Der Einfluß von Thioharnstoff und Cycloheximid auf die Aktivität der Phosphoribosylpyrophosphattransaminase

d:	7 - 8	9 - 10
	mE/mg Protein	
Kontrolle	10.18 ± 1.88 (4)	8.80 ± 2.82 (12)
Thioharnstoff	10.21 ± 6.12 (5)	10.21 ± 5.48 (11)
Cycloheximid	6.05 ± 3.21 (4)	10.88 ± 4.41 (3)

1 mE ≙ Bildung von 1 nmol Glutamat/min bei 37^0 C
d = Bebrütungstag
Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.

3.2.3. Beeinflussung der Ausscheidungsrate von Purinkörpern

Absicht war es zunächst die Auswirkungen der Substanzen auf die Xanthindehydrogenase (EC 1.2.1.37), die die Bildung von Harnsäure katalysiert, zu untersuchen.

Es war jedoch nicht möglich, eine Enzymaktivität im Embryohomogenat mit Hilfe der Methode nach SCHOLZ und FEATHERSTON (59) nachzuweisen. Hierzu wäre eine gezielte Untersuchung der Niere, die zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung die wichtigste Harnsäureproduktionstätte darstellt, erforderlich gewesen. Wegen der geringen Größe des Embryos konnte dieses Organ nicht gewonnen werden.
Es wurde daher versucht stickstoffhaltige Ausscheidungsprodukte, nämlich Harnsäure (Tab. 9), direkt in der Allantoisflüssigkeit zu erfassen. In der Allantoisflüssigkeit der Kontrollembryonen wie auch der der behandelten Embryonen erhöhte sich die Harnsäurekonzentration von 7. bis zum 10. Tag der Inkubation deutlich (Tab. 9). Unter dem Einfluß von L-Thyroxin war die Harnsäureausscheidung deutlich höher als bei den Kontrollen. Den größten Effekt auf die Harnsäureausscheidung hatte Thioharnstoff. Die Harnsäurekonzentration thyreostatisch behandelter Embryonen zeigte von 7. bis 8. Tag eine angedeutete, am 9. Tag und am 10. Tag eine signifikante Steigerung. Erhöhte Werte nach Antibiotikaapplikation ließen sich für Chloramphenicol eindeutig nur am 10. Tag nachweisen, während unter dem Einfluß von Cycloheximid die Werte nicht von den der Kontrollen abwichen.
Die ausgeschiedene Menge an Inosin, Hypoxanthin und Xanthin in die Allantoisflüssigkeit ist im Vergleich zur ausgeschiedenen Harnsäuremenge etwa um zwei Zehnerpotenzen geringer (Tab. 10).

Tab. 9 : Der Einfluß der applizierten Substanzen auf den Harnsäuregehalt der Allantoisflüssigkeit

d:	7	8	9	10
	Harnsäure (µmol/l)			
Kontrolle	1370.88 ± 451.61 (9)	1849.86 ± 402.82 (7)	2424.63 ± 656.29 (7)	3002.97 ± 577.75
Thyroxin	1561.88 ± 555.14 (6)	2186.63 ± 352.24 (6)	3533.11 ± 1166.91^{xx} (6)	4499.99 ± 1476.20^{xx}
Thioharnstoff	1616.62 ± 590.84 (6)	2279.45 ± 516.52 (6)	4620.18 ± 2080.72^{xx} (5)	4983.13 ± 628.32^{xxx} (7)
Cycloheximid	788.38 ± 312.38 (4)	1467.27 ± 283.82 (7)	2576.35 ± 1740.97 (7)	3451.00 ± 754.46 (7)
Chloramphenicol	1301.86 ± 290.36 (8)	2303.25 ± 749.11 (7)	3001.18 ± 1459.54 (8)	4303.04 ± 1248.31^{xx} (7)

d = Bebrütungstage
Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.

Vergleich mit gleichaltrigen Kontrollen:
xx = $p < 0.01$
xxx = $p < 0.001$

Tab. 10: Der Einfluß der applizierten Substanzen auf den Inosin-, Xanthin-, und Hypoxanthingehalt der Allantoisflüssigkeit

d: 9 - 10

(µmol/l)

	Inosin	Xanthin	Hypoxanthin
Kontrolle	26.06 ± 10.79 (8)	4.68 ± 2.74 (7)	16.59 ± 5.27 (9)
Thyroxin	25.29 ± 8.30 (12)	8.33 ± 5.09 (12)	13.14 ± 4.44 (12)
Thioharnstoff	60.84 ± 21.99^{xx} (6)	23.06 ± 4.02^{xxx}	24.25 ± 6.35^{xx} (7)
Cycloheximid	32.00 ± 19.50 (8)	6.86 ± 3.54 (8)	10.62 ± 2.83 (8)
Chloramphenicol	20.43 ± 6.67 (6)	8.13 ± 2.71 (6)	14.46 ± 4.07 (6)

Vergleich mit Kontrolle: xx = $p < 0.01$, xxx = $p < 0.001$

d = Bebrütungstage
Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.

Thioharnstoff bewirkte, wie bei der Harnsäure, auch bei diesen Purinkörpern eine gesteigerte Ausscheidungsrate. L-Thyroxin, Chloramphenicol und Cycloheximid hatten keine deutlichen Effekte auf die Konzentration von Inosin, Xanthin und Hypoxanthin in der Allantoisflüssigkeit.

3.3. Ergebnisse der Untersuchungen der späten Entwicklungsphase

3.3.1. Beeinflussung des Wachstums

Nachdem in den eben dargelegten Ergebnissen Hinweise für eine Beeinflussung der Entwicklung in der frühen embryonalen Phase durch die eingesetzten Substanzen erhalten wurden, sollte nun untersucht werden, inwieweit Auswirkungen auf die späte Entwicklungsphase (vom 17. bis 20. bzw. 21. Tag) auftreten. Dabei wurde auf den Einsatz von L-Thyroxin verzichtet, da von der Wirkung der Schilddrüsenhormone in der Endphase der Entwicklung bereits eingehende Ergebnisse vorliegen (6, 53, 75). Auch für Thioharnstoff in geringer Dosierung (1.5 mg/Ei), die den Schlupf nur um 24 h verzögert, wurden ausführliche Untersuchungen angestellt (75).

Hingegen wurden keine Experimente mit hohen Dosen von Thioharnstoff (2.5 mg/Ei), die eine Unterdrückung des Schlupfes bewirken, durchgeführt. In den folgenden Untersuchungen wurde Thioharnstoff in der hohen Konzentration eingesetzt.

Die Auswirkungen der applizierten Substanzen auf das Embryonalgewicht, auf den prozentualen Anteil des Embryogewichtes am Eigewicht sowie auf das Resteigewicht sind in Tab. 11, 12 und 13 ersichtlich.

Die behandelten Embryonen waren im Vergleich zu den Kontrollen nur geringgradig leichter (Tab. 11).

Tab. 11: Der Einfluß der applizierten Substanzen auf die Gewichtszunahme der Hühnerembryonen

d:	17	18	19	20
	Gewicht (g)			
Kontrolle	18.88 ± 1.64 (8)	21.59 ± 1.15 (13)	24.47 ± 2.98 (16)	29.34 ± 3.11 (8)
Thioharnstoff		20.43 ± 3.05 (6)	23.53 ± 1.58 (6)	27.23 ± 3.48 (12)
Cycloheximid	17.35 ± 1.57 (6)	20.48 ± 2.88 (8)	22.21 ± 3.41 (6)	28.74 ± 1.55 (8)
Chloramphenicol	18.20 ± 2.32 (6)	19.78 ± 3.12 (13)	23.94 ± 2.37 (12)	28.91 ± 2.42 (12)

d = Bebrütungstag
Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.

Tab. 12: Der Einfluß der applizierten Substanzen auf den prozentualen Anteil des Embryogewichtes am Gesamtei

d:	17	18	19	20
	% Embryogewicht am Eigewicht			
Kontrolle	34.14 ± 3.95 (8)	38.13 ± 5.29 (17)	46.17 ± 4.18 (15)	54.02 ± 5.25 (9)
Thioharnstoff	26.07 ± 4.62 (6)	36.02 ± 4.45 (6)	45.70 ± 2.42 (6)	49.03 ± 5.97 (10)
Cycloheximid	32.21 ± 2.80 (6)	37.18 ± 5.86 (8)	40.02 ± 6.68 (6)	50.02 ± 4.79 (6)
Chloramphenicol	33.03 ± 2.68 (6)	36.94 ± 7.82 (16)	44.05 ± 3.55 (13)	51.54 ± 2.63 (11)

d = Bebrütungstag

Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.

Tab. 13: Der Einfluß der applizierten Substanzen auf das Resteigewicht

d:	17	18	19	20
	Ei (g) - Embryo (g)			
Kontrolle	35.03 ± 3.00 (6)	34.46 ± 4.09 (17)	27.13 ± 2.70 (10)	26.66 ± 5.09 (12)
Thioharnstoff	39.40 ± 3.72 (6)	36.14 ± 1.86 (6)	27.99 ± 2.36 (6)	27.76 ± 4.57 (10)
Cycloheximid	36.53 ± 1.86 (6)	36.12 ± 4.70 (7)	33.56 ± 5.53 (6)	27.23 ± 2.28 (8)
Chloramphenicol	36.75 ± 2.06 (6)	34.67 ± 6.45 (16)	29.15 ± 4.69 (16)	26.57 ± 2.40 (12)

d = Bebrütungstag
Die Anzahl der Versuche ist
in Klammern angegeben.

Tab. 14: Der Einfluß der applizierten Substanzen auf das Verhältnis von Embryofeuchtgewicht zu Leberfeuchtgewicht

d:	17	18	19	20
	Embryo (g)/Leber (g)			
Kontrolle	46.07 ± 6.12 (9)	48.19 ± 5.08 (17)	49.50 ± 5.47 (14)	51.87 ± 4.91 (12)
Thioharnstoff	45.81 ± 5.34 (6)	45.40 ± 3.45 (6)	45.39 ± 1.75 (6)	44.15 ± 3.44 (14)
Cycloheximid	42.94 ± 1.74 (6)	41.73 ± 3.90 (8)	50.50 ± 5.94 (6)	51.75 ± 6.03 (8)
Chloramphenicol	41.55 ± 3.31 (6)	47.68 ± 3.97 (16)	48.29 ± 4.75 (16)	51.78 ± 5.78 (12)

d = Bebrütungstage
Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.

Die gleichen Ergebnisse spiegeln Tab. 12, die den von 17. bis 20. Tag zunehmenden prozentualen Gewichtsanteil der Embryonen am Gesamtei darstellt und Tab. 13 wider, die die von 17. bis 20. Tag abnehmenden Differenzen zwischen Ei und Embryo, also das Gewicht des restlichen Eiinhaltes und der Schale darstellt.
Wie Tab. 14 zeigt, nahm in der Endphase der Embryogenese der Quotient aus Embryo- und Lebergewicht vom 17. bis 20. Tag bei Kontrollembryonen sowie bei mit Antibiotika behandelten Embryonen zu, d. h. der Embryo wuchs im Verhältnis zur Leber schneller. Nach Einfluß von Thioharnstoff hingegen blieb dieser Quotient etwa gleich groß.

3.3.2. Beeinflussung der Phosphoribosylpyrophosphattransaminaseaktivität und der Glutamatkonzentration in der Leber

In einer weiteren Versuchsreihe interessierte, inwieweit die spezifische Aktivität der Phosphoribosylpyrophosphattransaminase, die einen limitierenden Faktor in der Purinkörpersynthese darstellt, sich unter Einwirkung der verschiedenen Substanzen verändert. Nach Tab. 15 kam es um den 19. Tag bei den Kontrollen zu einem Abfall der spezifischen Aktivität des Enzyms, dem am 20. Tag ein Anstieg folgte. Ein ähnlicher Verlauf ergab sich nach Applikation von Cycloheximid. Unter dem Einfluß von Thioharnstoff war dieser Abfall am 20. Tag angedeutet. Chloramphenicol

Tab. 15: Der Einfluß der applizierten Substanzen auf die Aktivität der Phosphoribosylpyrophosphattransaminase

d:	17	18	19	20
	mE/mg Protein			
Kontrolle	38.53 ± 10.56 (6)	35.89 ± 3.97 (9)	26.33 ± 9.40 (7)	40.90 ± 15.11 (8)
Thioharnstoff	44.56 ± 4.73 (6)	43.93 ± 7.65^{x} (6)	45.77 ± 4.92^{xx} (6)	35.08 ± 12.48 (6)
Cycloheximid	46.86 ± 5.32 (6)	48.20 ± 6.60^{xx} (8)	34.26 ± 4.41^{x} (6)	45.62 ± 14.79 (6)
Chloramphenicol	43.08 ± 16.15 (3)	29.42 ± 5.60^{x} (7)	25.41 ± 11.91 (6)	22.54 ± 2.91^{x} (6)

1 mE ≙ Bildung von 1 nmol Glutamat/min bei 37° C
d = Bebrütungstag
Die Anzahl der Versuche steht in Klammern.

Vergleich mit gleichaltrigen Kontrollen:
x = $p < 0.05$
xx = $p < 0.01$

Tab. 16: Der Einfluß der applizierten Substanzen auf dem Proteingehalt im Überstand der homogenisierten Leber

d:	17	18	19	20
	mg Protein/g Leberfeuchtgewicht			
Kontrolle	72.99 ± 7.04 (6)	69.03 ± 8.51 (9)	69.23 ± 9.16 (7)	63.02 ± 10.67 (6)
Thioharnstoff	70.19 ± 3.77 (6)	70.79 ± 4.55 (6)	75.37 ± 2.27 (6)	73.35 ± 4.00^{x} (6)
Cycloheximid	85.02 ± 1.82^{xx} (6)	72.77 ± 5.37 (8)	73.70 ± 8.51 (6)	69.95 ± 3.80 (6)
Chloramphenicol	72.51 ± 12.27 (4)	62.50 ± 4.07^{x} (8)	67.91 ± 9.33 (6)	77.85 ± 11.04^{x} (6)

d = Bebrütungstag
Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.

Vergleich mit gleichaltrigen Kontrollen:
xx = $p < 0.01$
x = $p < 0.05$

Tab. 17: Der Einfluß der applizierten Substanzen auf den Glutamatgehalt der embryonalen Leber

d:	17	18	19	20
	µmol Glutamat/g Leber			
Kontrolle	0.89 ± 0.23 (6)	0.85 ± 0.24 (12)	0.68 ± 0.19 (11)	0.87 ± 0.23 (12)
Thioharnstoff	1.04 ± 0.41 (6)	0.69 ± 0.18 (6)	0.72 ± 0.16 (6)	0.59 ± 0.24^{x} (6)
Cycloheximid	0.88 ± 0.16 (6)	0.69 ± 0.10 (8)	0.57 ± 0.15 (6)	0.70 ± 0.08 (6)
Chloramphenicol	0.73 ± 0.09 (4)	0.67 ± 0.16 (7)	0.50 ± 0.15^{xx} (6)	0.68 ± 0.21 (6)

d = Bebrütungstag
Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben,

Vergleich mit gleichaltrigen Kontrollen:
x = $p < 0.05$
xx = $p < 0.01$

verursachte diesen Abfall bereits am 18. Tag; diese Verringerung setzte sich bis zum 20. Tag fort.
Die Proteinkonzentration, die als Bezugsgröße für die spezifische Aktivität der Phosphoribosylpyrophosphattransaminase diente (Tab. 16), erniedrigte sich vom 17. bis zum 20. Tag sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den Embryonen, die mit Cycloheximid behandelt wurden. Auffallend ist hier jedoch der höhere Proteingehalt im Vergleich zu den Kontrolltieren.
Unter dem Einfluß von Thioharnstoff verringerte sich die Proteinkonzentration während des beobachteten Zeitraumes nicht.
Bei den mit Chloramphenicol behandelten Embryonen ist vom 18. bis 19. Tag ein Abfall der Proteinkonzentration angedeutet.
Schließlich wurde die Glutamatkonzentration in der Leber ermittelt (Tab. 17). Es zeigten sich weder bei den behandelten noch bei den unbehandelten Embryonen nenneswerte Veränderungen im Verlauf der letzten Tage der Embryogenese.

3.3.3. Beeinflussung von Lebermetaboliten

Von früheren Untersuchungen her war bekannt, daß gegen Ende der Inkubation Veränderungen des Cholesterin-, Farbstoff-, Glykogen-, und Glucose gehaltes der Leber auftreten (75, 76). In den fogenden Studien wurde untersucht, inwieweit diese Metaboliten durch Thioharnstoff,

Cycloheximid und Chloramphenicol beeinflußt werden.

Der Gehalt der Leber an Cholesterin stieg bei unbehandelten wie bei behandelten Embryonen während des Untersuchungszeitraumes deutlich an (Tab. 18). Unter dem Einfluß von Thioharnstoff und Cycloheximid war die Konzentrationszunahme verzögert.

Ähnlich wie das Cholesterin nahm auch das Leberpigment (Tab. 19) bei Kontrollen und behandelten Embryonen im Verlauf der Inkubation zu. Dabei fiel die geringere Zunahme unter dem Einfluß von Thioharnstoff im Vergleich zu den Kontrollen auf.

Die Glykogenkonzentration wurde im Überstand wie im Niederschlag des zentrifugierten Leberhomogenats bestimmt. Tab. 20. ist zu entnehmen, daß die Glykogenkonzentration sowohl im Überstand als auch im Niederschlag bei den Kontrollen im Verlauf der letzten Tage der Inkubation abnahm. Unter dem Einfluß von Cycloheximid war der Abfall erst am 20./21. Tag zu beobachten. Die Applikation von Thioharnstoff hatte eine Erhöhung des Glykogengehaltes der Leber zur Folge.

Die Untersuchung des Gehaltes an Leberglucose (Tab. 21) erbrachte bei Kontrollen und behandelten Embryonen übereinstimmend eine Steigerung vom 17. bis 21. Tag. Deutliche Unterschiede zwischen gleichaltrigen unbehandelten und behandelten Embryonen waren nicht erkennbar.

Tab. 18: Der Einfluß der applizierten Substanzen auf den Cholesteringehalt der embryonalen Leber

d:	17	18	19	20
	µmol Cholesterin/g Leber			
Kontrolle	50.18 ± 15.79 (7)	71.52 ± 10.92 (6)	76.23 ± 12.60 (6)	89.05 ± 26.49 (6)
Thioharnstoff	33.37 ± 19.61 (6)	62.71 ± 16.17 (6)	71.80 ± 14.35 (6)	72.14 ± 5.01 (6)
Cycloheximid		55.11 ± 19.38 (8)	60.05 ± 15.30 (6)	71.86 ± 16.53 (6)
Chloramphenicol	46.47 ± 19.99 (6)	69.38 ± 11.20 (6)	80.56 ± 11.08 (6)	96.03 ± 17.34 (6)

d = Bebrütungstage
Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.

Tab. 19: Der Einfluß der applizierten Substanzen auf den Pigmentgehalt der embryonalen Leber

d:	17	18	19	20
	E_{463nm}/g Leber			
Kontrolle	0.41 ± 0.25 (7)	0.81 ± 0.34 (7)	0.95 ± 0.22 (11)	1.61 ± 0.49 (10)
Thioharnstoff	0.25 ± 0.08 (6)	0.55 ± 0.16 (6)	0.78 ± 0.10 (6)	0.84 ± 0.16^{xxx} (6)
Cycloheximid	0.26 ± 0.08 (6)	0.53 ± 0.15^{x} (8)	0.93 ± 0.31 (6)	1.42 ± 0.43 (6)
Chloramphenicol	0.46 ± 0.09 (6)	0.57 ± 0.21 (11)	0.82 ± 0.25 (10)	1.44 ± 0.31 (7)

d = Bebrütungstage
Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.

Vergleich mit gleichaltrigen Kontrollen:
xxx = $p < 0.001$
x = $p < 0.05$

Tab. 20: Der Einfluß der applizierten Substanzen auf den Glykogengehalt der Leber

	d:	17 - 18	19	20 -21
		µmol Glykogen* /g Leber		
Kontrolle	A:	33.06 ± 20.10 (11)	31.09 ± 10.85 (6)	25.47 ± 13.84 (7)
	B:	24.01 ± 9.73 (11)	19.98 ± 5.02 (6)	18.47 ± 5.80 (7)
	C:	57.07 ± 29.83 (11)	51.07 ± 13.22 (6)	43.94 ± 19.64 (7)
Thioharnstoff	A:	26.75 ± 8.69 (14)	44.42 ± 16.15 (6)	58.72 ± 36.59 (11)
	B:	17.66 ± 5.59 (14)	33.10 ± 5.76 (6)	30.47 ± 9.13 (11)
	C:	44.41 ± 14.28 (14)	77.52 ± 19.66^{x} (6)	89.19 ± 45.72^{xx} (11)
Cycloheximid	A:	32.59 ± 16.43 (16)	43.30 ± 18.47 (7)	16.13 ± 11.43 (12)
	B:	25.76 ± 9.47 (16)	31.13 ± 10.78 (7)	15.00 ± 6.65 (12)
	C:	58.35 ± 25.90 (16)	74.42 ± 28.74 (7)	31.13 ± 18.08 (12)

* = gemessen als Glucose
d = Bebrütungstage
Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.

A = Glykogen im Überstand
B = Glykogen im Niederschlag
C = Gesamtglykogen

Vergleich mit Gesamtglykogen von gleichaltrigen Kontrollen:
x = $p < 0.05$
xx = $p < 0.01$

Tab. 21: Der Einfluß der applizierten Substanzen auf den Glucosegehalt der Leber

d:	17	18	19	20	21
	µmol Glucose/g Leber				
Kontrolle	4.90 ± 0.38 (4)	5.64 ± 0.33 (7)	6.30 ± 0.43 (4)	5.91 ± 0.50 (4)	7.37 ± 0.89 (4)
Thioharnstoff	6.01 ± 1.14 (6)	5.17 ± 0.40 (8)	6.15 ± 0.36 (6)	5.75 ± 0.57 (6)	8.08 ± 0.79
Cycloheximid	3.98 ± 0.62 (8)	5.69 ± 1.60 (8)	5.58 ± 0.29 (8)	5.53 ± 0.34 (8)	6.34 ± 0.90

d = Bebrütungstage
Die Anzahl der Versuche
ist in Klammern angegeben.

4. Diskussion

Frühe embryonale Phase

Thyreoide Hormone beeinflussen, wie im allgemeinen Teil näher dargelegt wurde, in der pränatalen Phase das Wachstum, indem sie über Stimulierung bestimmter Faktoren die Synthese spezifischer Proteine anregen (20, 44).
Bei Hühnerembryonen soll die Sekretion von Schilddrüsenhormonen zwischen dem 10. und 12. Tag der Inkubation einsetzen (6, 50). THOMMES und TONETTA (51) zeigten auf, daß diese Phase durch einen Anstieg an L-Thyroxin im Plasma, sowie durch gesteigerte Jodaufnahme der Schilddrüse gekennzeichnet ist.
Dieser Befund schließt jedoch nicht aus, daß exogenes L-Thyroxin bereits vor diesem Zeitraum eine Entwicklungsbeschleunigung auslöst.
Diese Annahme ist jedoch umstritten:
ROMIJN et. al. (53) konnten keinen Anstieg der Wachstumsrate von Hühnerembryonen vor dem 10. Tag der Bebrütung nach Verabreichung von L-Thyroxin feststellen.
Hingegen beobachtete BEYER (6) nach intraovaler Behandlung mit L-Thyroxin einen gesteigerten Anstieg von Feucht- und Trockengewicht ab dem 4. Tag der Inkubation.

Befunde in der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, daß exogenes L-Thyroxin schon vor dem 10. Tag der Inkubation eine metabolische Wirkung bei

Hühnerembryonen entfaltet. So war die Aktivität der Glutamatdehydrogenase (Tab. 6) und die ausgeschiedene Harnsäuremenge in die Allantois (Tab. 9) vom 7. bis 10. Tag höher als bei den Kontrollen. Der stimulierende Effekt des L-Thyroxins war zwar erst am 9. - 10. Tag signifikant, es zeichnete sich aber bei den Werten bereits am 7. - 8. Tag die stärker ansteigende Tendenz gegenüber den Kontrollen ab. Das deutet darauf hin, daß exogenes L-Thyroxin in der Lage ist, diese von der Entwicklung vorgegebenen Veränderungen deutlich früher als am 10. Tag zu steigern. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Vorstellung von BEYER, wonach L-Thyroxin schon vor der Reifung der Schilddrüse wirksam ist (6).

Es interessierte in diesem Zusammenhang, ob ein Thyreostatikum ebenfalls vor dem 10. Tag der Inkubation zum L-Thyroxin entgegengesetzte Effekte verursacht. Dabei zeigte sich, daß das eingesetzte Goitrogen Thioharnstoff eine deutliche Wachstumsverzögerung (Tab. 1) auslöste. Die Bestimmungen des zellulären Proteins (Tab. 2) ergaben, daß der Proteingehalt der Zellbestandteile im Vergleich zu den Kontrolltieren geringgradig vermindert war. Ein ähnliches Ergebnis wurde nach Applikation von radioaktiv markierter Glutaminsäure (Tab. 3, 4) beobachtet. Auch hier lagen die Einbauraten der radioaktiven Aminosäure geringgradig unter denen der Kontrolltiere. Diese Befunde legen die Vermutung nahe, daß der Effekt des Thioharnstoffs über eine verringerte Proteinsynthese zustande kommt.
Die Verfügbarkeit von ATP ist allem Anschein nach nicht die Ursache für die durch Thioharnstoff

bedingte verringerte Proteinsynthese, da, wie Tab. 5 zeigt, das Thyreostatikum keinen Einfluß auf den Nukleotidgehalt hat.
Die Beobachtung, daß Thioharnstoff schon vor dem 10. Tag der Inkubation wirksam ist, steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von ROMANOFF und LAUFFER (52). Der Grund, daß sie keinen spezifischen Effekt des Goitrogens vor dem Einsetzen der Schilddrüsenfunktion finden konnten, liegt möglicherweise darin, daß sie Thioharnstoff in das Eiklar applizierten und nicht, wie in den hier beschriebenen Versuchen, in die Luftkammer. Wahrscheinlich bedingte die hier verwendete Methode eine bessere embryonale Resorption.
Auffallend bei den in dieser Arbeit vorliegenden Befunden ist, daß Thioharnstoff zwar einen zum L-Thyroxin entgegengesetzten Effekt auf die Glutamatdehydrogenaseaktivität (Tab. 6) auslöste, jedoch ähnlich wie L-Thyroxin die Ausscheidung von Harnsäure in die Allantoisflüssigkeit stimulierte. Dabei ist zu bedenken, daß der Effekt von Thioharnstoff auf die Harnsäurebildung wesentlich deutlicher ausfiel.
In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß WITTMANN und PRUY (82, 49) in der embryonalen Leber unter dem Einfluß von Thioharnstoff wie auch von L-Thyroxin eine Steigerung der Aktivität der Xanthindehydrogenase, die die Harnsäurebildung katalysiert, kurz vor dem Schlupf aufzeigen konnten. Bei Kontrollembryonen soll die Aktivität der Xanthindehydrogenase in der Leber zu diesem Zeitraum kaum entwickelt sein, wie KATO (31), CROISILLE (13), STRITTMATTER (63) und FISCHER (21) berichten.

Auch hier war der Effekt des Thioharnstoffs wesentlich deutlicher. Möglicherweise ist die unterschiedliche Harnsäuremenge (Tab. 9) in der Allantois nach Behandlung mit L-Thyroxin bzw. Thioharnstoff ebenfalls auf eine unterschiedliche Aktivierung der Xanthindehydrogenase zurückzuführen.
Es bleibt zu klären, wie eine gleichsinnige Aktivierung der Xanthindehydrogenase - wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß - durch Thioharnstoff und L-Thyroxin möglich ist. WITTMANN und PRUY (82, 49) vermuten, daß L-Thyroxin die Aktivitätserhöhung der Xanthindehydehydrogenase über eine Neusynthese des Enzyms bewirkt, während Thioharnstoff die Enzymaktivität durch Substratinduktion steigert. Da in diesem Entwicklungsstatus vom 7. - 10. Tag die Aktivität der Xanthindehydrogenase der Leber kaum entfaltet ist, ist anzunehmen, daß der beobachtete Harnsäureanstieg über die Niere zustande kommt, die zu diesem Zeitpunkt die wichtigste Bildungsstätte der Harnsäure darstellt (7, 21).
Schließlich erhebt sich die Frage, über welchen Stoffwechselweg die gesteigerte Harnsäurebildung zustande kommt. Bekanntlich steht die Harnsäureausscheidung im Dienste des Nukleinsäure- und Proteinabbaus, wobei beim Vogel wegen des fehlenden Harnstoffzyklus der Ausscheidung von Stickstoff über die Harnsäure eine besondere Bedeutung zukommt (7, 21). PRUY (49) konnte zeigen, daß die mit Thioharnstoff gesteigerte Harnsäureproduktion in erster Linie durch den Nukleinsäureabbau und

nicht durch eine de novo Synthese des Puringerüstes aus stickstoffhaltigen Abbauprodukten zustande kommt.
In den Versuchen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die spezifische Aktivität der Glutamatdehydrogenase, die zum Aufbau des Puringerüsts führt, durch L-Thyroxin stimuliert und durch Thioharnstoff gehemmt wird (Tab. 6). Dieser Befund läßt vermuten, daß auf dieser Stufe die gesteigerte Harnsäurebildung (Tab. 9) unter dem Einfluß von Thioharnstoff nicht zustande kommt.
Da die spezifische Aktivität der Phosphoribosylpyrophosphattransaminase unter dem Einfluß von Thioharnstoff nicht erhöht wurde (Tab. 8), scheint ein gesteigerter Aufbau des Puringerüsts nicht die Ursache für die erhöhte Harnsäureentwicklung zu sein (Tab. 9). Es ist daher die Vermutung naheliegend, daß, ähnlich wie in der embryonalen Hühnerleber am Ende der Inkubation (49,82), auch in der frühen Phase der Entwicklung die gesteigerte Harnsäurebildung über einen verstärkten Nukleinsäureabbau bewirkt wird. Dieser könnte auch die Ursache für den oben angegebenen gestörten Proteinstoffwechsel und das daraus folgende geringere Wachstum darstellen.
Vergleicht man die Auswirkungen von Cycloheximid und Chloramphenicol, die wie Thyreostatika hemmend auf die Proteinsynthese einwirken (3, 34, 35, 60, 81), so fällt auf, daß sich unter dem Einfluß dieser beiden Substanzen, wenn auch nicht so deutlich wie bei Thioharnstoff, das Wachstum verlangsamt (Tab. 1). Im Falle der Glutamatdehydrogenase allerdings konnte kein

einheitlicher Effekt beobachtet werden.
(Tab. 6). Bei der Untersuchung der Harnsäureausscheidung in die Allantoisflüssigkeit war noch am ehesten bei Chloramphenicol eine Steigerung zu beobachten (Tab 9).
Auffallend ist auch noch, daß nur Thioharnstoff und nicht die Antibiotika die Ausscheidung von Inosin, Xanthin und Hypoxanthin stimulieren (Tab. 10).
Das legt die Vermutung nahe, daß der hemmende Einfluß von Thioharnstoff auf das Wachstum des Hühnerembryos in anderer Weise zustande kommt als der der Antibiotika.
Zur Klärung dieser Frage sind jedoch noch weitere Untersuchungen erforderlich.

Späte embryonale Phase

Im 2. Abschnitt der Arbeit wurde untersucht, inwieweit Thioharnstoff, Cycloheximidund Chloramphenicol in der späten Phase der Entwicklung eingreifen (2, 6, 24, 75).
Dabei zeigte sich, daß die verabreichten Substanzen im großen und ganzen nur eine geringe Wachstumsverzögerung bewirkten. Dies geht aus den Tab. 11, 12 und 13 hervor, die das Embryogewicht, den prozentualen Anteil des Embryogewichtes am Eigewicht und das Resteigewicht aufzeigen.
Auffallend ist, daß das Verhältnis Embryogewicht zu Lebergewicht, welches bei den Kontrollen, wie bei den mit Antibiotika behandelten Embryonen mit zunehmenden Alter anstieg,

während es unter dem Einfluß von Thioharnstoff etwa gleich blieb (Tab. 14). Dies ist in erster Linie auf ein im Vergleich zum Körpergewicht rascher zunehmendes Lebergewicht zurückzuführen. Offensichtlich manifestiert sich die Wirksamkeit von Thioharnstoff in diesem Organ.

Dies ist auch daraus zu ersehen, daß die Zunahme des Leberpigmentes (Tab. 19) und der Cholesterinkonzentration (Tab. 18) bzw. die Abnahme der Glykogenkonzentration (Tab. 20) unter dem Einfluß von Thioharnstoff deutlich verzögert war.

Unter physiologischen Bedingungen steht die Veränderung dieser Metaboliten in enger Beziehung zum Schlupfgeschehen. Die Zunahme des Cholesterin- und Pigmentgehaltes der Leber steht in enger Beziehung mit der Inkorporierung des Dottersackes gegen Ende der Inkubation (42, 51 , 75, 76), während der Abbau des Glykogens durch die Ausbildung einer Hypoxie verursacht wird (16, 58, 66, 83). Unter dem Einfluß von Thioharnstoff wurde der Schlupf jedoch deutlich verzögert bzw. unterdrückt. Es ist daher verständlich, daß sich auch diese Schlupfparameter nicht in dem Umfang wie bei den Tieren, die den Schlupf durchführten, veränderten.

Es ist zu bemerken, daß Chloramphenicol im Gegensatz zu Thioharnstoff und Cycloheximid einen gesteigerten Einbau von Cholesterin in die Leber bewirkte (Tab. 18).

Im Gegensatz zur frühen embryonalen Phase waren in der Leber der späten embryonalen Phase Auswirkungen von Thioharnstoff und den Antibiotika auf die Aktivität der Phosphoribosylpyrophosphattransaminase zu beobachten (Tab. 8, 15). Dieses Enzym wies in der Leber (Tab. 15) einen entwicklungsabhängigen Verlauf auf, der sich in einem Aktivitätsabfall bei den Kontrollen vom 19. - 20. Tag zeigte. Unter dem Einfluß von Thioharnstoff vollzog sich der Aktivitätabfall erst vom 19. - 20. Tag, was auf einen verzögerten Entwicklungsstatus dieser Embryonen hinweist. Auffallend ist die im Vergleich zu den Kontrollen erhöhte Aktivität der Phosphoribosylpyrophosphattransaminase unter dem Einfluß von Cycloheximid und der vorzeitige Abfall vom 17. auf den 18. Tag bei chloramphenicolbehandelten Embryonen. Die Ursachen hierfür können aus diesen Befunden nicht geklärt werden.
Insgesamt zeichnet sich, ähnlich wie in der frühen embryonalen Phase, Thioharnstoff durch eine besondere Wirksamkeit aus. Offensichtlich greift Thioharnstoff in anderer Weise in das Stoffwechselgeschehen ein als Cycloheximid und Chloramphenicol. Inwieweit die Wirkung von hohen Dosen von Thioharnstoff in der Endphase der Embryogenese über eine Proteinsynthesehemmung zustande kommt bleibt noch zu klären. Neueren Befunden zufolge vollzieht sich die Unterdrückung des Schlupfes durch dieses Thyreostatikum über eine Hemmung der Lungeentfaltung, wobei das Einsetzen der Lungendurchblutung unterdrückt wird (25).

Möglicherweise greift Thioharnstoff über eine gesteigerte Bildung an Leukotrienen, die konstriktorisch auf die Lungengefäße wirken (15), in den Kreislauf ein.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von L-Thyroxin, Thioharnstoff, Cycloheximid und Chloramphenicol auf die Embryogenese des Huhnes untersucht.
Während der frühen Phase der Embryonalentwicklung wirkte exogen zugeführtes L-Thyroxin stimulierend auf die Aktivität der Glutamatdehydrogenase und auf die Harnsäureausscheidung in die Allantois.
Thioharnstoff hingegen löste eine Abnahme der Glutamatdehydrogenaseaktivität und eine Wachstumsverzögerung aus. Besonders deutlich war außerdem die Ausscheidung verschiedener Purinkörper in die Allantois.
Unter dem Einfluß der Antibiotika war vor allem bei Cycloheximid eine Wachstumsverzögerung zu beobachten.
In der späten embryonalen Phase hatte lediglich Thioharnstoff deutliche Auswirkungen auf den Quotienten aus Leber/Embryo sowie auf den Glykogen-, Cholesterin- und Pigmentgehalt der Leber.
Die Wirkungen von Thioharnstoff auf die Embryogenese sind möglicherweise nur zum Teil auf eine Hemmung der Proteinsynthese zurückzuführen.

Summary

Embryogenesis of the chick under the influence of L-thyroxine, thiourea, cycloheximide and chloramphenicol.

In the studies presented here, the influence of L-thyroxine, thiourea, cycloheximide and chloramphenicol on embryonic development of the chick was investigated.
During the early period of the development exogenous L-thyroxine exerted a stimulatory effect on glutamate dehydrogenase and on the uric acid excretion into the allantoic fluid.
Thiourea, however, decreased glutamate dehydrogenase activities and growth rate.
Furthermore a significant enhancement of the excretion of avian purine derivates has been recorded.
Under the influence of antibiotics, mainly cycloheximide released a retarded effect on growth.
During the late period of development only thiourea led to significant effects on the ratio liver/body weight and on hepatic glycogen, cholesterol and the pigment.
The developmental effects released by thiourea may only partially be attributed to restricted protein synthesis.

6. Literaturverzeichnis

1. ARNOLD H., NAJJAR S., BLIZZARD R. M., 1974
Effects of thyroid hormone on growth, differentiation and development
in: Endocrinology, Sec. 7; R. O. Greep, E. B. Astwood (eds.), 377 - 389

2. BALABAN M., HILL J., 1971
Effects of thyroxin level and temperature manipulations upon the hatching of chick embryos
Developm. Psychobiol. 4 (1), 17 - 35

3. BASS R., 1975
Significance of mitochondrial function for embryonic development: Proposal of a mechanism for the induction of embryolethal effects
in: New approaches to the evaluation of abnormal embryonic development; D. Neubert, H. J. Merker (eds.), 524 - 541

4. BERNT E., BERGMEYER H. U., 1970
in: Methoden der enzymatischen Analyse; H. U. Bergmeyer (ed.), 1659 - 1663

5. BEUTIN L., 1981
Antibiotika und chemische Wirkstoffe in der Tierernährung

Biol. i. u. Z. 11, 129 - 130

6. BEYER R. E., 1952
The effect of thyroxin upon the general metabolism of the intact chickembryo
Endocr. 50, 497 - 502

7. BROWN G. W. jr., 1970
in: Comparative biochemistry of nitrogen metabolism; J. W. Campbell (ed.), 711 - 792

8. BROWN J. G., BATES P. C., HOLLIDAY M. A., MILLWARD D. J., 1981
Thyroid hormones and muscle protein turnover
Biochem. J. 194, 771 - 782

9. CARTER J. W., BENJAMIN v. d. W., FAAS F. H., 1981
Effect of experimental hyperthyroidism on skeletal - muscle proteolysis
Biochem. J. 194, 685 - 690

10. CILIEVICI O., TRAISTARU T., 1978
Skeletal alterations induced by chloramphenicol in chick embryo
Morphol. Embryol. 24, 27 - 33

11. CODY V., 1980
Thyroid hormone interactions: molecular confirmation, protein binding and hormone action
Endocr. Rev. 1 (2), 140 - 166

12. COLOMBO B., FELICETTI L., BAGLIONI C., 1965
Inhibition of protein synthesis by cycloheximide in rabbit reticulocytes
Biochem. Biophys. Research. Commun. 18, 389 - 395

13. CROISILLE Y., 1963
Carnegie Inst. Washington, Yearbook 62, 428 - 437

14. CZEMPIEL W., 1975
Mapping of ribosomal proteins from mammalian mitochondria
in: New approaches to the evaluation of abnormal embryonic development; D. Neubert, H. J. Merker (eds.), 550 - 553

15. DAUBER J., PLUSS W., STENMARK K., WEIL J., VOELKEL L., 1983
Leucotrienes in thiourea induced lung injury edema
Am. Rev. Resp. Dis. 127, 304

16. DAWKINS M. J. R., 1963
Glycogen synthesis and breakdown in rat liver at birth
Q. J. Exp. Phyiol. 48, 265 - 272

17. DECUYPERE E., HERMANS C., MICHELS H., KÜHN E. R., VERHEYEN J., 1980
Thermoregulatory response and thyroid hormone concentration after cold exposure of young chicks treated with jopanoic acid or saline
Adv. Physiol. Sci. Vol. 33, 291 - 299

18. DECUYPERE E., KÜHN E. R., CLIJMANS B., NOUWEN E. J., Michels H., 1980
Direct evidence for prenatal monodeiodation in the chick embryo
in: Abstracts; 28. Intern. Congr. f. Physiol., Budapest, 373

19. ELLIOT H. W., 1955
Glutaminsynthesis
in: Methods in enzymology; S. P. Colowick, N. O. Kaplan (eds.), 2, 337 - 342

20. FISCHER D. A., HOATH S., LAKSMANAM J., 1982
The thyroid hormone effects on growth and development may be mediated by growth factors
Endocr. Exp. 16, 259 - 271

21. FISCHER J. R., 1967
Patterns of nitrogen metabolism and excretion in some vertebrate embryos
in: Biochemistry of animal development; R. Weber (ed.), 2, 413 - 434

22. FREEMAN B. M., VINCE M. A., 1974
Development of the avian embryo
Chapman and Hall (eds.), London

23. GARBER A. J., JOMAIN - BAUM M., SALGANICOFF L., FARBER E., HANSON R., 1973
The effects of cycloheximide on energytransfer in rat and guinea pig liver mitochodria
J. Biol. Chem. 248 (5), 1530 - 1535

24. GASPARD K. J., KLITGAARD H. M., WONDERGEM R., 1981
Somatomedin and thyroid hormones in the developing chick embryo
Exp. Bio. Med. 166, 24 - 27

25. HAMMEL W., 1983
Über den Lipidstoffwechsel der Kükenlunge im Verlauf der perinatalen Entwicklungsphase
Inaugural - Dissertation, Tiermed. Fakultät München

26. HAYASHI Y., HERMANN H., 1959
in: Develop. Biol. 1, 437

27. IMAI K., SUZUKI M., TAKIKAWA H., 1980
Changes in iodine metabolism and monoiodohistidine as a major inert iodine compound in the developing chick embryo
Intern. Thyr. Congr. 8, 38

28. JAWOREK D., GRUBER W., BERGMEYER H. U., 1970
in: Methoden der enzymatischen Analyse; H. U. Bergmeyer (ed.), 2020 - 2024

29. JAWOREK D., GRUBER W., BERGMEYER H. U., 1970
in: Methoden der enzymatischen Analyse; H. U. Bergmeyer (ed.), 2051 - 2055

30. KAICK v. G., GRÖTTLER K., 1968
Technik und Probleme teratologischer Studien am bebrüteten Hühnerkeim
Kurze wiss. Mitt. 17

31. KATO Y., 1960
Carnegie Inst. Washington,
Yearbook 60, 379

32. KEPPLER D., DECKER K., 1970
in: Methoden der enzymatischen Analyse;
H. U. Bergmeyer (ed.), 1089 - 1094

33. KÖHLER E., 1970
Growth kinetics of mammalian embryos during organogenesis
in: Metabolic pathways in mammalian embryos;
F. U. Berlin, 17 - 28

34. KRASNOW S. H., BURKA E. R., BALLAS S. K., 1981
Effect of puromycin, cycloheximide and concanavalin A on in vitro synthesis of human reticulocyte membrane proteins
J. Biochem. 13, 707 - 711

35. KROWKE R., 1970
Studies on the incorporation of ^{14}C-glucose and ^{32}P into nucleic acids and other cell components of rat embryos in vivo
in: Metabolic pathways in mammalian embryos;
F. U. Berlin, 99 - 122

36. KÜHN E. R., BOLLEN M., DARRAS V., 1982
Fetal growth inhibition and decreased thyroid activity after injection of oestradiol benzoate into pregnant rats
J. Endocr. 93, 55 - 63

37. LEE J. J., 1981
Determination of chloramphenicol and its application to residues in milk and dairy cows
Dissertation, Leiden

38. MC. NABB F. M., MC. NABB R. A., 1977
Thyroid development in precocial and altrical avian embryos
The Auk 94, 736 - 743

39. MC. NABB R. A., STOUFFER R. L., MC. NABB F. M. A. 1972
Thermoregulatory ability and the thyroid gland: their development in embryonic japanese quail
Comp. Biochem. Physiol. 43 (A), 187 - 193

40. NEUBERT D., 1970
Activity of DNA and RNA polymerases in isolated nuclei of mammalian embryos
in: Metabolic pathways in mammalian embryos; F. U. Berlin, 79 - 98

41. NICKEL R., SCHUMMER A., SEIFERLE E., 1973
in: Anatomie der Hausvögel; Paul Parey, 85 - 86

42. NOBLE G., MOORE J. H., 1966
in: Physiology of the domestic fowl
Horton Smith C. (ed.), 87 - 96

43. OLSON J. A., ANFINSON C. B., 1952
The crystallization and characterisation of L-glutymic acid dehydrogenase
J. biol. Chem. 197, 67 - 79

44. OPPENHEIMER J. H., DILLMANN W. H., SCHWARTZ H. L., TOWLE H. C., 1979
Nuclear receptors and thyroid hormone action: a progress report
Fed. Proc. 38, 2154 - 2161

45. PATTEN B. M., 1948
Extraembryonic membranes
in: The early embryology of the chick,
B. M. Patten (ed.) 114 - 128

46. PATTEN B. M., 1948
The urinary system
in: The early embryology of the chick,
B. M. Patten (ed.), 193 - 199

47. PHILIPSON K. D., EDELMAN J. S., 1977
Thyroid hormone control of $Na^+ - K^+$ - ATPase and K^+ - dependent phosphatase in rat heart

Am. J. Physiol. 1 (3)
196 - 201

48. POLANSKY J. R., TOOLE B. P., 1976
Hyaluronidase activity during thyroxin-induced tadpole metamorphosis
Developm. Biol. 53, 30 - 35

49. PRUY J., 1982
Die Aktivität der Xanthindehydrogenase und ihr Einfluß auf die Harnsäurebildung in der embryonalen Kükenleber
Inaugural - Dissertation, Tiermed. Fakultät München

50. RAHEJA K. L., LINSCHEER W. G., 1979
Lipid and carbohydrate metabolism in euthyroid and hypothyroid chick embryos
Comp. Biochem. Physio. 64 B, 289 - 291

51. ROMANOFF A. L., 1967
Biochemistry of the avian embryo; Wiley (ed.), New York

52. ROMANOFF A. L., LAUFFER H., 1956
The effect of injected thiourea on the development of some organs of the chick embryo
J. Physiol. 92, 219 - 227

53. ROMIJN C., FUNG K. F., LOKHORST W., 1952
Thyroxine, thiouracil and embryonic respiration in white leghorns
Poult Sci. 31, 684 - 691

54. ROODYN D. B., FREEMAN K. B., TATA J. R., 1965
The stimulation by treatment in vivo with thriiodothyronine of amino acid incorporation into protein by isolated rat liver mitochondria
Biochem. J. 94, 628 - 641

55. SACHS L., 1974
in: Angewandte Statistik; Springer
230 - 238

56. SALEM Z., MURRAY T., 1981
The nitroreduction of chloramphenicol by human liver tissue
Jorn. Lab. Clin. Med., 881 - 886

57. SAYED - EL M., HEAF D. J., GLOVER J., 1980
Effect of changing photoperiod in plasma-thyroxine-binding prealbumin in japanese quail
Gen. a. Comp. Endocr. 41, 539 - 545

58. SCHLOSSMAN H., 1938
The carbohydrate metabolism of the foetal dog under the influence of insulin
J. Physiol. 92, 219 - 227

59. SCHOLZ R. W., FEATHERSTON W. R., 1968
Effect of alterations in protein intake on liver xanthin dehydrogenase in the chick
J. Nutr. 95, 272 - 280

60. SISLER H. D., SIEGEL M. R., 1967
Cycloheximide and other glutarimide antibiotics
in: Antibiotics; D. Gottlieb, P. Shaw (eds.)
1, 283 - 307

61. SPIERS D. E., Mc. NABB R. A., Mc. NABB F. M. A., 1974
The development of thermoregulatory ability, heatseeking activities and thyroid function in hatching japanese quail
J. comp. Physiol. 89, 159 - 174

62. STOLL R., COULAND H., FAUCOUNAU N., MARAUD R., 1966
Sur l'action tératogène des hormones thyroidiennes chez l'embryon des poulet. Les méchanismes morphogénétiques de la strophosomie

Archs. Anat. microsc. Morph. exp. 55,
59 - 76

63. STRITTMATTER C. F., 1965
Studies on avian xanthin dehydrogenase, properties and patterns of appearance during development
J. Biol. Chem. 240, 2557 - 2564

64. SUN T. P., 1932
Histo - physogenesis of the glands of internal secretion - thyroid, adrenal, parathyroid and thymus - of the chicken embryo
Phys. Zoöl. 5 (3), 384 - 395

65. TAPLEY D. F., 1962
The mechanism of action of thyroid hormones
Am. zool. 2, 373 - 378

66. THEMANN H., 1963
Elektronenoptische Untersuchungen über das Glykogen im Zellstoffwechsel
Veröff. Morph. Path., 1 - 105

67. THOMMES R. C., HYLKA V. W., 1977
Plasma iodothyronines in the embryonic

and immediate post - hatch chick

Gen. Corp. Endocr. 32, 417 - 422

68. THOMMES R. C., HYLKA V. W., 1978
Hypothalamo - adenohypophyseal - thyroid interrelationships in the chick embryo
Gen. Corp. Endocr. 34, 193 - 200

69. THOMMES R. C., JAMESON K. M., 1980
Hypothalamo - adenohypophyseal - thyroid interrelationships in the chick embryo
Gen. Corp. Endocr. 42, 267 - 269

70. THOMMES R. C., PALL J. S., 1974
Effects of hypophysectomy by surgical decapitation on histochemically demonstrable peroxidase activity in the thyroid gland of the developing chick embryo
Gen. Corp. Endocr. 23, 52 - 57

71. THOMMES R. C., TONETTA S. A., 1979
Hypothalamo - adenohypophyseal - thyroid interrelationships in the chick embryo
Gen. Corp. Endocr. 37, 167 - 176

72. THOMMES R. C., VIETH R. L.,LEVASSEUR S., 1977
The effects of hypophysectomy by means

of surgical decapitation on the thyroid function in the developing chick embryo

Gen. a. Comp. Endocr. 21, 29 - 36

73. TRAKATELLIS A. C., MONTJAR M., AXELROD A. E., 1965
Effect of cycloheximide on polysomes and protein synthesis in the mouse liver

Biochem. 4, 2065 - 2071

74. TUCHMANN - DUPLESSIS H., 1970
Investigations of the mechanism of action of triton W. R. 1339

in: Metabolic pathways in mammalian embryos; F. U. Berlin, 205 - 217

75. WEISS A., 1979
Der Einfluß des Thyroxins und Thioharnstoff auf biochemische Vorgänge der Kükenleber in der perinatalen Phase

Inaugural - Dissertation, Tiermed. Fakultät München

76. WEISSENBECK J. S., 1981
Der Einfluß der Gaszusammensetzung der Luftkammer auf das Schlupfgeschehen und den Leberstoffwechsel des Kükenembryos

Inaugural-Dissertation, Tiermed. Fakultät München

77. WIEDEMANN G., BASS R., 1970
Proteinsynthesis in microsomal and ribosomal fractions of mammalian embryonic tissue
in: Metabolic pathways in mammalian embryos; F. U. Berlin, 153 - 173

78. WILLIAMS J., 1965
Chemical constitution and metabolic activities of animal eggs
in: The biochemistry of animal development; R. Weber (ed.), Ac. Press, 14 - 61

79. WILLIAMS J., 1967
Ydk utilisation
in: The biochemistry of animal development; R. Weber (ed.), Ac. Press, 343 - 378

80. WITTMANN H. G., 1972
in: Sonderforschungsbereich 29: "Embryonale Entwicklung und Differenzierung (Embryonalpharmakologie)"
Jahresbericht 1971/72, 180 - 185

81. WITTMANN H. G., 1975
in: Sonderforschungsbereich 29: "Embryonale Entwicklung und Differentierung (Embryonalpharmakologie)"
Jahresbericht 1973/75, 292 - 313

83. WULF de H., 1971
The control of glycogen metabolism in the liver
Louvain (ed.)

84. UEHLIN M., BASS R., 1975
Evaluation of a possible action of chloramphenicol/thiamphenicol on microsomal/ribosomal protein synthesis from rat embryos
in: New approaches to the evaluation of abnormal embryonic development; D. Neubert, H. J. Merker (eds.), 542 - 549

85. ZIMMERMAN H. J., 1978
Hepatotoxity, the adverse effects of drugs and other chemicals on the liver; New York 468 - 476

All denen, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben, möchte ich an dieser Stelle danken:

Herrn Prof. Dr. H. Zucker danke ich dafür, daß er mir einen Arbeitsplatz im Institut bereitgestellt hat

Herrn Dr. habil. Dr. J. Wittmann, der mir das Thema überließ, danke ich ganz besonders für die hilfreiche Betreuung meiner Arbeit

Frau B. Hofer danke ich für die wertvollen Auskünfte in technischen Fragen

Lebenslauf

Roswitha Elisabeth Fremmer	8000 München 40 Schwindstraße 18 Rkg.
Geburtstag, Geburtsort	3. 5. 57, Oberleupoldsberg/Oberfranken
Familienstand	ledig
Schulen	1963 - 67 Grundschule "Ev. Verbandsschule Räumlas" 1967 - 74 Gymnasium "Math. nat. Gymn. Naila" 1974 - 76 Gymnasium "Staatl. Landschulheim Marquartstein, math. nat. Gymnasium"
Abitur	24. 5. 1976
Studium	1976 - 82 Fach Tiermedizin an der Ludwig-Maximilian-Universität, München
Approbation	28. 7. 82
Dissertation	ab August 1982
Berufstätigkeit	1. 1. - 31. 9. 1983 wissenschaftl. Hilfskraft im Institut für Tierphysiologie der LMU München ab 1. 1. 84 mikrobiologische Tätigkeit im Labor Dr. Schuler in Berg bei Starnberg